

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTICÂNCER DE LECTINAS VEGETAIS

Edson Holanda Teixeira

Ham. T 574.192 T265a

Autor: Teixeira, Edson Hol

Título: Avaliação do potencial anticâncere



013838731

Ac. 69892

BCT

FORTALEZA
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE DOUTORADO EM BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE LECTINAS VEGETAIS

EDSON HOLANDA TEIXEIRA

FORTALEZA

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

sf. 2

R13838731 (EXEMPLAR DISPONÍVEL)

A69892

T
574.192
T265a

T265a

Teixeira, Edson Holanda

Avaliação do potencial anticarie de lectinas vegetais/ Edson
Holanda Teixeira.- Fortaleza:2005.

106f.: il.

Tese (Doutorado) em Bioquímica – Universidade Federal do
Ceará.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

1.Lectinas 2.Cárie dental 3.Bactérias 4. Biofilmes I.Título

C.D.D. 574.192

C.D.U. 547.953

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE LECTINAS VEGETAIS

EDSON HOLANDA TEIXEIRA

Aprovada em 14/02/2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
BioMol- Lab Universidade Federal do Ceará
Presidente

~~Prof. Dr. Jorge Luiz Matins
IQG/ Universidade Federal de Pelotas~~

Profa. Dra. Ana Maria Assreuy
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto
Faculdade de Medicina de Sobral
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcus José Fernandes de Oliveira
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
Universidade Federal do Ceará

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Dedico ao meu filho Edson

Júnior e ao meu afilhado

Maurício Neto

AGRADECIMENTOS

Este livro é dedicado aos meus pais, especialmente ao pai, por sua coragem e determinação em lutar por uma vida melhor para todos. Também agradeço aos meus amigos e colegas que me apoiaram e incentivaram durante todo o processo de escrita. Um agradecimento especial ao meu professor, Sr. João Carlos, por sua orientação e paciência. Por fim, agradeço a todos os que leram e gostaram deste livro, pois é o maior reconhecimento que posso ter.

Este livro é dedicado ao Sr. Gonçalves, por sua orientação e paciência durante o processo de escrita. Também agradeço aos meus amigos e colegas que me apoiaram e incentivaram durante todo o processo de escrita. Um agradecimento especial ao meu professor, Sr. João Carlos, por sua orientação e paciência. Por fim, agradeço a todos os que leram e gostaram deste livro, pois é o maior reconhecimento que posso ter.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota”.

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

- Ao grande amigo Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada: Por ter tido paciência nos momentos das minhas angústias; por não ter medido esforços para que essa pesquisa fosse realizada conjuntamente com os grupos paulistas; por ter vibrado sempre com os resultados; por ser esse cara sempre estimulador do pensar; por achar valores escondidos nas pessoas; por ter comprado a briga de desenvolver pesquisa odontológica dentro de um laboratório de química de proteínas; por ter sido corajoso em orientar o primeiro dentista, desde iniciação científica até o doutorado, no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

- Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves por ter apostado na idéia mesmo diante de um simples contato por e-mail e por ter me recebido em seu laboratório da maneira tão cordial. Também por suas orientações com relação a publicações e direcionamento das pesquisas.

- Ao Prof. Dr. Marcos Toyama por não ter colocado empecilhos em inserir a bactéria *S. mutans* em seus rotineiros ensaios de microscopia eletrônica assim como também a Profa. Daniela Toyama pela realização dos ensaios de atividade antimicrobiana.

- Ao estudante de doutorado Marcelo Henrique Napimoga. Inicialmente por ter me recebido em sua casa em duas ocasiões em Piracicaba e por não ter medido esforços em trabalhar arduamente nesses ensaios, desde a concepção das idéias a realização das mesmas. Por ter conseguido e fornecido as pérolas de hidroxiapatita essenciais nos ensaios em Fortaleza e por ter apostado nas lectinas inclusive direcionando seu doutorado para os estudos dessas proteínas.

- Ao primo Prof. Dr. Dárlcio Inácio Alves Teixeira. Sempre serei grato por ter intermediado o primeiro encontro com o Prof. Benildo Cavada e por se preocupar sempre com todos, obviamente a sua maneira.

- À todos os integrantes do BioMol Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas) do departamento de Bioquímica e Biologia molecular da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio constante .

- Ao bolsista Victor Carneiro por conta dos ensaios de marcação de lectinas e pela valiosa ajuda nos ensaios de caracterização de glicoproteínas salivares.

- À bolsista Taianá Oliveira pela valiosa colaboração na geração das publicações.

- Aos demais professores, bolsistas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo carinho a mim dedicado.

- À minha esposa Suzana Lourdes Ferreira Frota Teixeira pelo amor, pela paciência e pelo apoio.

- Ao meu filho Edson Júnior por ter me propiciado momentos de pura descontração, importantíssimos nos intervalos da redação desse texto.

- À minha querida mãe Maria Francineuma Holanda que eu agradeço por tudo que eu sou, pelos valores que eu tenho e especialmente por ser o meu poço de confiança.

- À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	14
Lista de Abreviaturas	16
Resumo	17
Abstract	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Lectinas	19
1.1.1. Histórico	19
1.1.2. Definição	20
1.1.3. Estrutura das lectinas	22
1.1.4. Diversidade das lectinas	24
1.1.5. Aplicabilidade biológica de lectinas	28
1.2. Cárie dental	32
1.2.1. Aspectos gerais	32
1.2.2. Biofilme dental	34
1.2.3. A multifatorialidade da cárie dental	36
1.2.4. A progressão da cárie dental	39
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo principal	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Lectinas	44
3.2. Saliva	44
3.3. Bactérias	46
3.4. Formação de película adquirida ao esmalte (PAE) em pérolas de hidroxapatita para ensaio de marcação de película através de lectina associada ao Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	46
3.5. Associação de lectinas com FITC (Isotiocianato de fluoresceína)	46

3.6. Ensaio de marcação de película adquirida (PAE) com lectinas associadas com FITC	47
3.7. Ensaio de inibição de adesão bacteriana através do tratamento da película adquirida (PAE) com lectinas vegetais	48
3.8. Determinação da atividade antibacteriana	49
3.8.1. Atividade antibacteriana contra <i>S. mutans</i>	49
3.8.2. Microscopia eletrônica de transmissão	50
3.8.3. Microscopia eletrônica de varredura	50
4 RESULTADOS	52
4.1. Resultado do Ensaio de marcação de película adquirida (PAE) com lectinas associadas com FITC	52
4.2. Resultado da reversão do efeito de lectinas no ensaio de marcação de película adquirida (PAE) com lectinas associadas com FITC	57
4.3. Resultado do teste de termoestabilidade da lectina de alga marinha <i>Bryothamnion seaforthii</i>	57
4.4. Resultado do ensaio de inibição de adesão bacteriana através do tratamento da película adquirida (PAE) com lectinas.	57
4.5. Resultado da atividade antibacteriana de lectinas vegetais contra <i>S. mutans</i>	61
4.6. Resultado da análise de microscopia eletrônica	72
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Esquema demonstrador da classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995a) e Van Damme *et al.* (1998) 22
- FIGURA 2.** Estrutura quaternária da lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* evidenciando os sítios de ligação a açúcar e os sítios Ca^{++} e Mn^{++} 24
- FIGURA 3.** As diferenças das estruturas de carboidratos entre os grupos sanguíneos ABO 29
- FIGURA 4.** Placa Bacteriana observada ao exame clínico com sonda periodontal milimetrada 35
- FIGURA 5.** Modelo de Keyes Modificado 39
- FIGURA 6.** Evolução do processo de cárie 40
- FIGURA 7.** Visualização em microscópio de fluorescência do controle negativo do ensaio de marcação de película adquirida no aumento de 100x. 52
- FIGURA 8.** Visualização em microscópio de fluorescência do controle negativo do ensaio de marcação de película adquirida no aumento de 200x. 52
- FIGURA 9.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* associada à FITC (visualização realizada ao microscópio óptico (100x)) 53
- FIGURA 10.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* associada à FITC (visualização realizada ao microscópio de fluorescência (100x)) 53
- FIGURA 11.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Dioclea violacea* associada à FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x). 54

- FIGURA 12.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Dioclea violacea* associada à FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x) 54
- FIGURA 13.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* associada à FITC (visualização realizada ao microscópio óptico (100x)) 54
- FIGURA 14.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* associada à FITC (visualização realizada ao microscópio de fluorescência (100x)) 54
- FIGURA 15.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* associada à FITC visualizada ao Microscópio de fluorescência (100x) 55
- FIGURA 16.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* associada à FITC visualizada ao Microscópio de fluorescência (100x) 55
- FIGURA 17.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina isolada da alga *Bryothamnion seaforthii* associada ao FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x). 56
- FIGURA 18.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de alga *Bryothamnion seaforthii* associada à FITC visualizada ao Microscópio de Fluorescência (100x) 56
- FIGURA 19.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina isolada da alga *Bryothamnion triquetrum* associada ao FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x). 56
- FIGURA 20.** Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina isolada da alga *Bryothamnion triquetrum* associada ao FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x). 56

- FIGURA 21.** Evolução da marcação de película adquirida através de lectinas da alga *Bryothamnion seaforthii* em função do tempo de fervura 59
- FIGURA 22.** Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus sanguis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 62
- FIGURA 23.** Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus oralis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 64
- FIGURA 24.** Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus mitis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 66
- FIGURA 25.** Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus sobrinus* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 68

- FIGURA 26.** Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus mutans* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 70
- FIGURA 27.** Atividade antibacteriana de lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violaea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa* 72
- FIGURA 28.** Controle negativo da atividade de lectinas nas culturas de *S. mutans* incubadas somente com salina durante uma hora 72
- FIGURA 29.** Controle negativo da atividade de lectinas nas culturas de *S. mutans* incubadas somente com salina durante uma hora 72
- FIGURA 30.** Microscopia eletrônica de varredura de *S. mutans* incubadas por uma hora com a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA) 73
- FIGURA 31.** Microscopia eletrônica de varredura de *S. mutans* incubadas por uma hora com a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA) 73
- FIGURA 32.** Microscopia eletrônica de varredura de *S. mutans* incubadas por uma hora com a lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) 73
- FIGURA 33.** Microscopia eletrônica de varredura de *S. mutans* incubadas por uma hora com a lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr). 73
- FIGURA 34.** Microscopia eletrônica de varredura do controle negativo (Salina) 74

FIGURA 35. Microscopia eletrônica de varredura do efeito da lectina DVL sobre <i>S. mutans</i>	74
FIGURA 36. Fotomicrografia eletrônica de transmissão do controle negativo (Salina)	74
FIGURA 37. Fotomicrografia eletrônica de transmissão do efeito da DVL sobre <i>S. mutans</i>	74
FIGURA 38. Fotomicrografia eletrônica de varredura do controle negativo (Salina)	75
FIGURA 39. Fotomicrografia eletrônica de varredura do efeito da LSL sobre <i>S. mutans</i>	75
FIGURA 40. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando o controle negativo (Salina)	75
FIGURA 41. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando o efeito da LSL sobre <i>S. mutans</i>	75
FIGURA 42. Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando o controle negativo (salina)	76
FIGURA 43. Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando o efeito da VML sobre <i>S. mutans</i>	76
FIGURA 44. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando o controle negativo (Salina)	76
FIGURA 45. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando o efeito da VML sobre <i>S. mutans</i>	76

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Lista das espécies das quais foram isoladas as lectinas utilizadas nos experimentos juntamente com sua especificidade por carboidrato, matriz cromatográfica usada no isolamento e referência da metodologia utilizada 45
- TABELA 2.** Espécie e cepa dos microorganismos utilizados na pesquisa 46
- TABELA 3.** Grau de marcação de película adquirida (PAE) através das lectinas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus*, *Vatairea macrocarpa*, *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum* quando incubadas em solução juntamente com as pérolas cobertas com PAE ou quando pré incubadas com seus respectivos açúcares específicos ou Mucina, no caso das lectinas de algas marinhas. 58
- TABELA 4.** Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus sanguis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 63
- TABELA 5.** Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus oralis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 64

TABELA 6. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus mitis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 66

TABELA 7. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus sobrinus* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 68

TABELA 8. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus mutans* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos 70

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l	microlitros
ATCC	"American Type Culture Collection"
BS	Lectina da alga <i>Bryothamnion seaforthii</i>
BT	Lectina da alga <i>Bryothamnion triquetrum</i>
CFU	Unidade formadora de colônia
Con A	Lectina de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>
Con Br	Lectina de sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DVL	Lectina de sementes de <i>Dioclea violacea</i>
ELAM 1	Molécula de Adesão leucócito - Endotelial 1
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Ftf	Frutosil transferase
Gtf	Glicosil transferase
HIV	Vírus da Imundeficiencia Humana
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	intravenoso
KDa	KiloDalton
LAM 1	Molécula de Adesão de leucócito 1
LSL	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i>
M	Molar
MBL	Lectina ligadora à manose
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ml	mililitro
PAE	Película adquirida do esmante
PBS	Solução tampão fosfato
PHA	Lectina de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>
Rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
VML	Lectina de sementes de <i>Vatairea macrocarpa</i>
WGA	Lectina de trigo

RESUMO

Nas últimas décadas, temos acompanhado um avanço muito grande em relação à etiologia e à prevenção da cárie dentária, mas, mesmo assim, dados epidemiológicos têm demonstrado que esta continua sendo, dentro da odontologia, a doença de maior prevalência. Um dos fatores etiológicos mais importantes da cárie são os microorganismos de origem bacteriana que formam um biofilme patogênico que se adere à superfície dental, de modo a produzir ácidos que levam a desmineralização do esmalte dental. Os microorganismos não se depositam ou aderem diretamente à superfície do esmalte dental, mas se ligam a uma fina camada acelular composta por proteínas salivares e outras macromoléculas que recobrem as superfícies dentárias, denominada película adquirida. As bactérias interagem com a película adquirida através de uma série de mecanismos específicos, dentre eles a interação do tipo lectina. Lectinas são proteínas de origem não imune, possuindo pelo menos um domínio não catalítico de ligação a carboidrato e capazes de ligar-se a mono ou oligossacarídeos específicos. A adesão bacteriana envolve as adesinas localizadas na superfície bacteriana e os receptores na película. O objetivo dessa tese foi avaliar possível potencialidade anticariogênica das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa*, e das lectinas isoladas das algas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum*. Os resultados demonstram que as lectinas são capazes de interagir com a película adquirida e que as lectinas de algas interagem mais fortemente do que as outras lectinas estudadas. No estudo de inibição da adesão bacteriana a película "in vitro" verificamos que as lectinas estudadas são efetivas contra as seguintes cepas: *Streptococcus mutans*, *S.sobrinus*, *S.sanguis*, *S.oralis* e *S.mitis*. As lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *C.brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa* foram, também, eficientes em inviabilizar unidades formadoras de colônias de *S.mutans* após um contato prévio a incubação. Os dados encontrados apontam para um grande potencial anticárie dessas moléculas sendo possível sua utilização destas tanto como ferramentas de estudo na caracterização glicídica de película adquirida, quanto na profilaxia, visto que existem dois mecanismos de ação potencialmente eficazes: a inibição da adesão bacteriana a PAE e o efeito antibacteriano. Finalmente, o presente estudo indica a necessidade de estudos com aprofundamento em cada uma das lectinas, assim como a utilização de modelos de biofilmes mais fidedignos, experimentação "in vivo", testes de citotoxicidade de lectinas e protocolos em humanos para que se possa pensar na inserção de uma ou mais lectinas em um produto importante na prevenção da cárie e da doença periodontal.

ABSTRACT

During the past few decades has been established a great advance related to the etiology and dental carie prevention. However, epidemiologic data have demonstrated that it continues to be the most prevalent disease among all others in odontology. One important etiologic factor for this disease is the formation of a pathogenic bacteria biofilm that adheres to the dental surface, producing acids that lead to dental enamel demineralization. These bacteria not adhere directly to dental enamel surface, but bind to a thin non cellular layer composed by saliva proteins and other macromolecules that recover dental surface, this layer is named acquired pellicle. Bacteria interact with this layer through several specific mechanisms and the lectinic interaction is one of them. Lectins are proteins from non-immune origin that have at least one non-catalitic domain which binds reversibly to specific carbohydrates. Bacterial adherence involves adhesins located in the bacteria surface and pellicle receptors. This thesis aimed to evaluate the possible anti cariogenic potential of lectins extracted from *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* and *Vaitarea macrocarpa* seeds and from red marine algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. The results show that lectins are able to interact with the acquired pellicle and that algae lectins are the ones among all tested which have the stronger interaction. In the bacteria adhesion inhibition assay it's been verified that the lectins tested are effective against the following strains: *Streptococcus mutans*, *S.sobrinus*, *S.sanguis*, *S.oralis* and *S.mitis*. Lectins from *Canavalia ensiformis*, *C.brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* and *Vatairea macrocarpa* seeds were also able to make the *S.mutans* colony forming units not viable, after having a previous contact before the incubation. The results found point out to a great anti caries potential of these molecules, giving subsidies to a possible use as tools in carbohydrate characterization of the acquired pellicle and in prophylaxis, since they act through two mechanisms potentially effective: inhibiting bacteria adherence to the acquired pellicle and antibacterial effect. At last, the present work indicates that further studies are needed with emphasis in which one of the lectins; these studies should use other biofilm models (that may retract better the mouth environment), "in vivo" experimentation, lectins cytotoxicity assays and the development of a protocol for human use. These assays are fundamental to allow the use of one or more of these proteins in products that prevent caries and periodontal disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lectinas

1.1.1. Histórico

O termo "Lectinologia", uma expressão introduzida por Potapov (1968), surgiu para designar uma área de estudos inteiramente voltada à pesquisa sobre uma classe especial de proteínas denominadas lectinas. O primeiro grande fato na história da lectinologia foi o estudo pioneiro sobre a aglutinação de eritrócitos por extratos de sementes de *Ricinus communis* promovido por Hermann Stillmark (1888) durante seu doutorado na Universidade de Dorpat (Estônia). Ele observou que ao misturar os extratos das sementes com sangue, os eritrócitos eram aglutinados. A partir de então, surgiu o termo fitohemaglutininas por se pensar, na época, que os compostos aglutinadores eram exclusivamente vegetais.

Outro pioneiro no estudo de lectinas foi o pesquisador Karl Landsteiner que iniciou novos estudos utilizando aglutininas vegetais como ferramentas para o descobrimento dos grupos sanguíneos A, B e O (LANDSTEINER e RAUBITSCHKE, 1907).

Nas primeiras décadas do século XX o número de trabalhos que tinham como alvo o estudo de lectinas crescia assustadoramente. Estes estudos puderam comprovar o efeito aglutinante de lectinas em eritrócitos, leucócitos, hepatócitos e células renais devido a propriedades específicas e não por simples toxicidade (WIENHAUS, 1909; ASSMAN, 1911; SCHNEIDER, 1912; DOSET e HENLEY, 1917; BOYD e REGUERA, 1949).

No início dos estudos com lectinas acreditava-se que princípios tóxicos eram responsáveis pelas propriedades de hemaglutinação e hemólise. Somente muitos anos depois as lectinas responsáveis pelos efeitos tóxicos foram classificadas separadamente (OLSNES e PIHL, 1982).

Durante aproximadamente 100 anos, a partir Stillmark (1888), a pesquisa nesta área focalizou principalmente lectinas de vegetais superiores. Vários trabalhos foram fundamentais no sentido de esclarecer inúmeros aspectos ligados à detecção, purificação, caracterização, especificidade, mecanismos de ação e estrutura dessas proteínas. Em decorrência desses estudos, vários avanços permitiram observar que as lectinas poderiam ser continuamente melhor definidas, o que tem justificado as sucessivas adaptações ocorridas até o presente para definir estas moléculas.

O isolamento da concanavalina A por cromatografia de afinidade trouxe um novo período para a história das lectinas (AGRAWALL e GOLDSTEIN, 1967).

Hodiernamente os estudos estão avançando em grande velocidade e novas lectinas de todas as classes de seres vivos estão sendo isoladas e caracterizadas em tempo recorde. Métodos de isolamento mais refinados, novos estudos utilizando bioinformática, novas técnicas de seqüenciamento de proteínas e DNA, modelamento e a cristalização de proteínas, além do número gigantesco de publicações estão a cada dia facilitando o entendimento dessas macromoléculas e, além disso, formatando novas formas de aplicações específicas tanto como ferramentas biológicas quanto em terapêutica.

1.1.2. Definição

A primeira definição de lectinas foi proposta por Boyd e Shapleigh (1954). Estes autores utilizaram o termo lectina (do latim, *legere* - capaz de escolher, selecionar) para lembrar o aspecto seletivo de ligação de certas proteínas de sementes a eritrócitos humanos. Eles demonstraram essa seletividade em 1954 quando verificaram que extratos de sementes de *Phaseolus vulgaris* aglutinavam eritrócitos de apenas alguns indivíduos.

A idéia de especificidade de ligação aliada à conscientização do carácter ubíquo destas proteínas na natureza levou ao surgimento de uma nova definição para lectinas. Goldstein *et al.* (1980) as definiram como proteínas de

origem não imune, capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a compostos contendo carboidratos e de aglutinarem células e glicoconjugados.

Peumans e Van Damme (1995a) definiram lectinas como proteínas de origem não imune, possuindo pelo menos um domínio não catalítico de ligação a carboidrato capazes de ligar-se a mono ou oligossacarídeos específicos. Desta maneira, amplia-se o grupo de proteínas que se comportam como lectinas, mas são diferentes do ponto de vista de suas propriedades aglutinantes e/ou de precipitação de glicoconjugados.

Fundamentado nas características estruturais observadas, as lectinas foram, divididas, conforme Peumans e Van Damme (1995b) e Van Damme *et al.* (1998) em quatro grupos principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas são definidas como proteínas compostas exclusivamente de um único sítio ligante a carboidratos e, por causa de sua natureza monovalente, não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Como exemplo, podemos citar as proteínas monoméricas das orquídeas (VAN DAMME *et al.*, 1994).

As hololectinas são também constituídas por sítios ligantes a carboidratos, possuindo, dois ou mais destes sítios idênticos ou homólogos. A este grupo pertencem muitas lectinas de plantas, como a concanavalina A, que apresentam múltiplos domínios ligantes e são, portanto, potencialmente capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados.

As quimerolectinas, como a ricina, compreendem todas as lectinas que possuem além do sítio de ligação a carboidratos, uma região, apresentando atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida, agindo independentemente dos sítios ligantes de carboidratos, e que, dependendo do número destes sítios ligantes a carboidratos, podem comportar-se como merolectinas ou hololectinas.

As superlectinas possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, os quais são, estruturalmente, diferentes e reconhecem açúcares distintos (Figura 1).

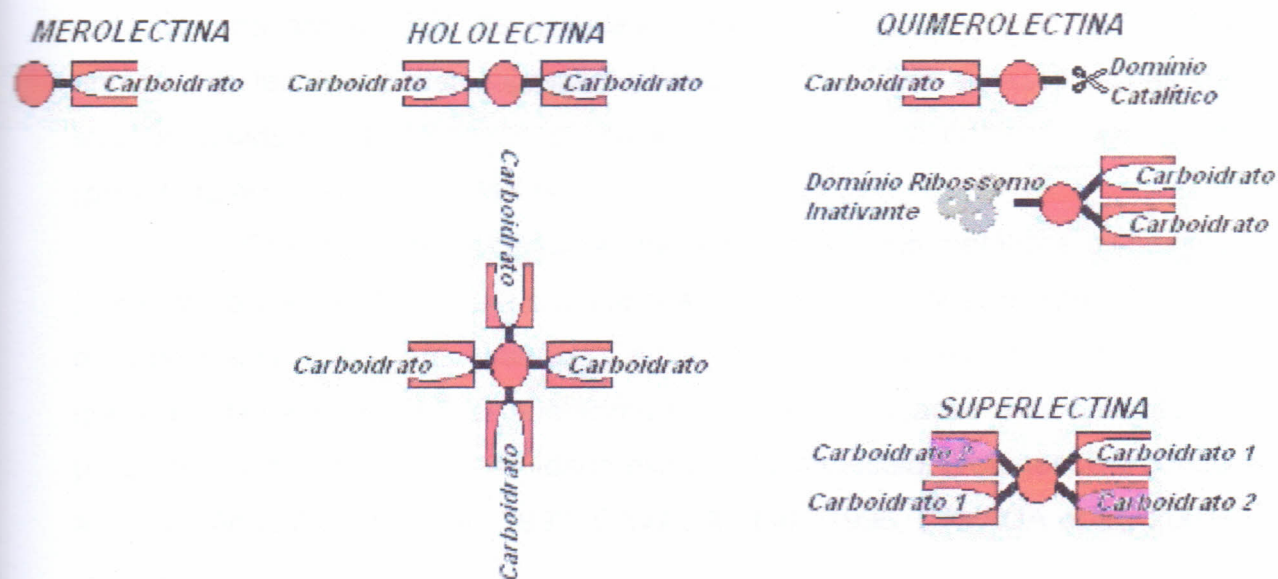


FIGURA - 1. Esquema demonstrador da classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995a) e Van Damme *et al.* (1998).

1.1.3. Estrutura das Lectinas

As lectinas constituem um grupo de proteínas bastante heterogênea. Desta forma, são caracterizadas por uma grande diversidade estrutural, podendo diferir em vários aspectos tais como: composição de aminoácidos, massa molecular aparente, estrutura e número de subunidades, estrutura terciária, e ainda, pelo fato de conterem ou não íons metálicos ou cátions bivalentes em sua estrutura.

A massa molecular aparente das lectinas varia de 3,5 - 4,0 kDa (lectina de *Crotalaria striata*, KHANG *et al.*, 1990) à 480 kDa (lectina de rizoma de *Aegopodium podagraria*, PEUMANS *et al.*, 1985). Outra característica observável é a presença em sua estrutura de carboidratos e cujo grau de glicosilação varia dentre as espécies (SHARON e LIS, 1989a).

As lectinas consistem de subunidades, cujo número varia entre 1, no caso da lectina de rizomas de *Urtica dioica* (PEUMANS *et al.*, 1984) a 10, no caso de uma das lectinas de *Araucaria angustifolia* (DATTA *et al.*, 1991). No entanto, as lectinas podem apresentar diferentes padrões de associações de suas subunidades dependendo da característica do meio onde se encontram (pH e temperatura) (SUSHAMA *et al.*, 2003).

Grande parte das lectinas necessitam de íons metálicos divalentes (geralmente Ca^{++} e Mn^{++}) para exercer a atividade de reconhecimento e ligação a carboidratos. Estes íons ligam-se a sítios específicos na estrutura protéica, o que é fundamental para o estabelecimento do sítio de ligação a carboidratos e para conferir alto grau de estabilidade estrutural à molécula, protegendo-a contra a inativação (CAVADA *et al.*, 1993; CAVADA *et al.*, 1996, CAVADA *et al.*, 2001) (Figura 2).

Um outro sítio de ligação das lectinas que tem sido explorado é caracterizado por ser constituído principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Como o próprio nome sugere a existência deste sítio diversifica a natureza das substâncias com as quais as lectinas podem interagir. Segundo Lis e Sharon (1986), trata-se de um tipo de ligação que não é inibida por açúcares específicos, portanto, a interação dos ligantes hidrofóbicos com as lectinas ocorre em sítios de ligação diferentes daqueles que ligam os carboidratos.

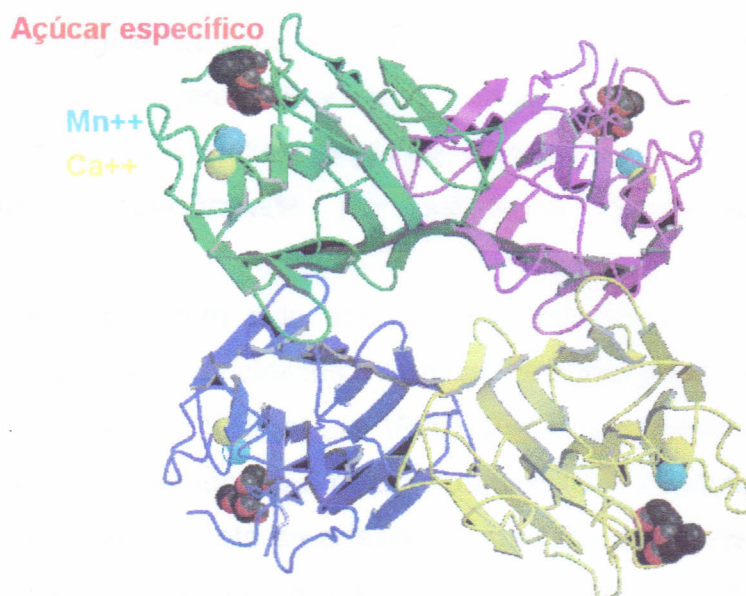


FIGURA - 2. Estrutura quaternária da lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* evidenciando os sítios de ligação a açúcar e os sítios Ca^{++} e Mn^{++} .

1.1.4. Diversidade das lectinas

As lectinas, principalmente as de plantas superiores, são classificadas de acordo com suas especificidades por carboidratos (monossacarídeos, oligossacarídeos e derivados). O estabelecimento desta especificidade através da técnica de inibição da atividade hemaglutinante proposta por Landsteiner (1902), tem sido de grande valia para os estudos bioquímicos e imunoquímicos até então realizados com estas proteínas. Para o desenvolvimento destes testes, soluções de diversos açúcares são utilizadas e comparadas até que finalmente determina-se a concentração mínima dos compostos inibidores. Apesar dos avanços nos estudos de afinidade das lectinas por oligossacarídeos, a classificação destas proteínas ainda é feita pela especificidade por monossacarídeos estabelecida por Makela (1957): Grupo I - reúne as lectinas inibidas por L-fucose; Grupo II - engloba as lectinas com especificidade por galactose/N-acetilgalactosamina; Grupo III - constituído pelas

lectinas específicas por glicose/manose; Grupo IV - encerra as lectinas com afinidade por idose/gulose/L-glicose/ e xilose. Outros grupos foram adicionados a esta classificação geral, incluindo as lectinas específicas por N-acetilglicosamina e ácido siálico. Algumas lectinas, por outro lado, exibem preferencialmente especificidade por estruturas complexas tais como glicoproteínas.

Apesar de terem sido encontradas originalmente em plantas, as lectinas ocorrem em todas as classes e famílias de seres vivos, desde bactérias e vírus até mamíferos (LIENER *et al.*, 1986). Em vírus, a lectina parece estar envolvida no processo de adesão à célula hospedeira. A infecção pelo vírus da influenza é iniciada pelo evento de adesão, mediada por uma hemaglutinina da capa do vírion que reconhece e se liga a resíduos de ácido siálico da superfície celular (GLICK *et al.*, 1991). Nas células dentríticas estão sendo identificados receptores lectínicos envolvidos diretamente na infecção pelo HIV (TURVILLE *et al.*, 2003).

Numerosas bactérias produzem lectinas de superfície comumente fazendo parte das fímbrias. As várias lectinas de bactérias parecem funcionar nas etapas iniciais das infecções, por exemplo, quando ocorre a aderência das bactérias a células epiteliais do trato urinário e gastrintestinal. As lectinas de bactérias também podem agir como moléculas de reconhecimento na fagocitose (SHARON, 1987). As lectinas também estão envolvidas no processo de adesão de *Corynebacterium diphtheriae* aos seus hospedeiros (COLOMBO *et al.*, 2001). Muitas enterobactérias, como *Escherichia coli* e *Salmonellae spp.*, possuem lectinas na sua superfície, fazendo parte das fímbrias. Em alguns casos, como em *Pseudomonas aeruginosa*, a lectina é intracelular, não estando presente na superfície celular (SHARON e LIS, 1989b). A *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno com importância etiológica em doenças periodontais, liga-se através de suas fímbrias a estruturas periodontais contendo glicoproteínas, evidenciando claramente um efeito tipo lectina (SOJAR *et al.*, 2004).

Em protozoários, a lectina de *Entamoeba histolytica* parece desempenhar importante papel na etapa de aderência à célula hospedeira

(células epiteliais do cólon), possuindo ainda, um papel na citotoxicidade celular, distinto da função de aderência (SAFFER e PETRY, 1991).

Lectinas ocorrem também em fungos (*Rhizoctonia solani*, KELLENS e PEUMANS, 1991; *Pholiota aurivella*, KAWAGISHI *et al.*, 1991; *Agaricus bisporus*, PEASANT e KORNFELD, 1972) e há muito tem sido dada importância ao papel das lectinas nas interações entre fungos e bactérias (PISTOLE, 1981).

Em algas marinhas, o número de trabalhos envolvendo lectinas é ainda pequeno, porém tem crescido bastante nos últimos anos. A primeira lectina de alga marinha isolada foi a da alga vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS *et al.*, 1977). As algas vermelhas são as que apresentam o maior número de espécies com atividade hemaglutinante seguidas das algas pardas e verdes (SAMPAIO, 1997). Em geral as lectinas de algas marinhas apresentam valores mais baixos de pesos moleculares, variando de 4,2 kDa para as isolectinas de *Hypnea japonica* (HORI *et al.*, 1986) e 9,3 kDa para *Hypnea musciformes* (NAGANO *et al.*, 2002) até 64,5 kDa para a lectina de *Ptilota serrata* (ROGERS *et al.*, 1990). De uma maneira geral, a atividade hemaglutinantes das lectinas de algas marinhas não são dependentes da adição de cátions divalentes e não são inibidas pela presença de açúcares simples (SAMPAIO, 1992; SAMPAIO, 1997).

Em invertebrados, as lectinas estão presentes em praticamente todas as classes examinadas como caranguejos (UMETSU *et al.*, 1991), larvas de insetos (GRUBHOFFER e MATHA, 1991), carrapatos (SHARON e LIS, 1989b), ouriço do mar (YAMADA e AKETA, 1982) e insetos (YU e KANOS, 2000), onde estão presentes principalmente na hemolinfa e órgãos sexuais (SHARON e LIS, 1989b). Recente publicação sugere que uma lectina presente em *Armigeres subalbatus* é responsável pela imunidade inata desse inseto a bactérias (WANG *et al.*, 2004). A lectina de *Helix pomatia*, uma espécie de lesma, é a mais conhecida entre as de invertebrados, aglutinando especificamente hemácias humanas do tipo A e sendo inibida por N-acetilgalactosamina (HAMMARSTROM, 1972).

Em vertebrados as lectinas se apresentam de duas maneiras: solúveis ou ligadas a membranas. Uma grande variedade tem sido encontrada

em diferentes tecidos de mamíferos, aves e répteis, algumas semelhantes, outras bastante diferentes em sua estrutura molecular e especificidade por carboidratos. Lectinas de membranas têm sido encontradas em fígado de vários animais (rato, coelho e galinha), em hepatócitos e em células de Kupffer (SHARON e LIS, 1989a). Foi também identificada a presença de lectinas em membranas de linfócitos de porco (BEZOUKA *et al.*, 1990). Em répteis, foram encontradas lectinas com propriedades físico-químicas semelhantes nos venenos das cobras *Agkistrodum contortrix*, *Ancistrodum piscivorous* e *Crotalus atrox* (GARTNER e OGILVIE, 1984). Com o passar dos anos ao analisarmos publicações, nos deparamos com a ratificação da ubiquidade dessas proteínas já isoladas em todas as classes de seres vivos e em vírus. Na pele de peixes, especificamente, tem sido isolada uma lectina cálcio dependente com funções ainda não muito claras (SUZUKI *et al.*, 2004).

Em seres humanos, dentre os vários tipos de lectinas existentes, uma delas possui importância fundamental no mecanismo de deflagração do sistema complemento, o que, recentemente, modificou todo o entendimento imunológico dessa cascata de proteínas por indicar uma nova via além da clássica e da via alternativa entendidas como únicas até então. Trata-se da "mannan-binding lectin" ou MBL que é capaz de disparar a fixação do complemento após ligar-se à estrutura de algum microorganismo invasor (NAUTA *et al.*, 2004). Isto está evidenciando agora que essa lectina é capaz de promover a opsonização do vírus HIV 1, entretanto, esse efeito ainda não foi capaz de neutralizar o vírus. Compreende-se esse dado científico como fonte primária de um estudo com vistas a promover a cura dessa infecção (YING *et al.*, 2004). A "mannan-binding lectin" tem sido relatada também como uma lectina com grande potencial em remover imunocomplexos circulantes, que são responsáveis por inúmeras doenças autoimunes como o lupus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide (SAEVARSDOTTIR *et al.*, 2004).

As selectinas são moléculas reconhecedoras de oligossacarídeos que intermedeiam a interação celular com o endotélio (BUCK, 1995). A L-selectina está expressa nos linfócitos, neutrófilos, macrófagos e monócitos e foi

identificada por anticorpo monoclonal que bloqueia a adesão dos linfócitos em um receptor específico designado por LAM-1. A E-selectina (endotelial) também foi identificada por anticorpo monoclonal e inicialmente foi reconhecida como molécula de adesão celular endotélio-leucócito (ELAM-1). A sua expressão no endotélio é transitória quando induzida por citocinas como interleucina-1, fator de necrose tumoral e interferon (POBER *et al.*, 1987). A P-selectina (plaquetária) foi originalmente identificada nas plaquetas. Os ligantes para cada selectina incluem carboidratos (BUCK, 1995; MOORE *et al.*, 1991).

As lectinas, por apresentarem propriedades particularmente interessantes, têm sido empregadas largamente no campo da fisiologia, bioquímica e ciências biomédicas. Entretanto, nenhum destes estudos conseguiu responder de modo claro e definitivo a intrigante pergunta feita continuamente por todos interessados no estudo desta classe de proteínas: qual seria o papel fisiológico das lectinas? Várias propostas já foram formuladas com relação a esta questão, especialmente no que tange as lectinas de vegetais superiores. Cada vez mais evidências têm sido descobertas indicando um papel de defesa dentro das plantas, já que sua especificidade em muitas delas é contra glicoconjugados não-vegetais (PEUMANS e VAN DAMME, 1995b). Particularmente em leguminosas, as lectinas estão também envolvidas no reconhecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio com o propósito de estabelecer a simbiose entre a planta e o microorganismo. Proteínas com domínios semelhantes aos de lectinas de leguminosas também foram encontrados em células animais (LORIS, 2002).

1.1.5. Aplicabilidade Biológica de lectinas

A maneira mais usada para se identificar a presença de lectinas (hololectinas ou superlectinas) em uma preparação protéica é através da atividade hemaglutinante, onde hemácias humanas e/ou de diferentes animais são utilizadas. Eritrócitos tratados com enzimas proteolíticas têm sido usados no sentido de aumentar a sensibilidade das hemácias à aglutinação, na medida em

que, eventualmente, estes tratamentos expõem mais os receptores apropriados nas membranas das hemácias. Ainouz e Sampaio (1991) observaram que extratos de diferentes algas marinhas aglutinavam de maneira diferenciada hemácias humanas dos sistemas ABO e de outros animais quando tratadas com tripsina. Em alguns casos, a aglutinação pode ser efetiva contra os eritrócitos tratados com enzimas proteolíticas (tripsina, papaína, subtilisina e bromelaína), mas não contra os eritrócitos não tratados (AINOUZ *et al.*, 1992) (Figura 3).

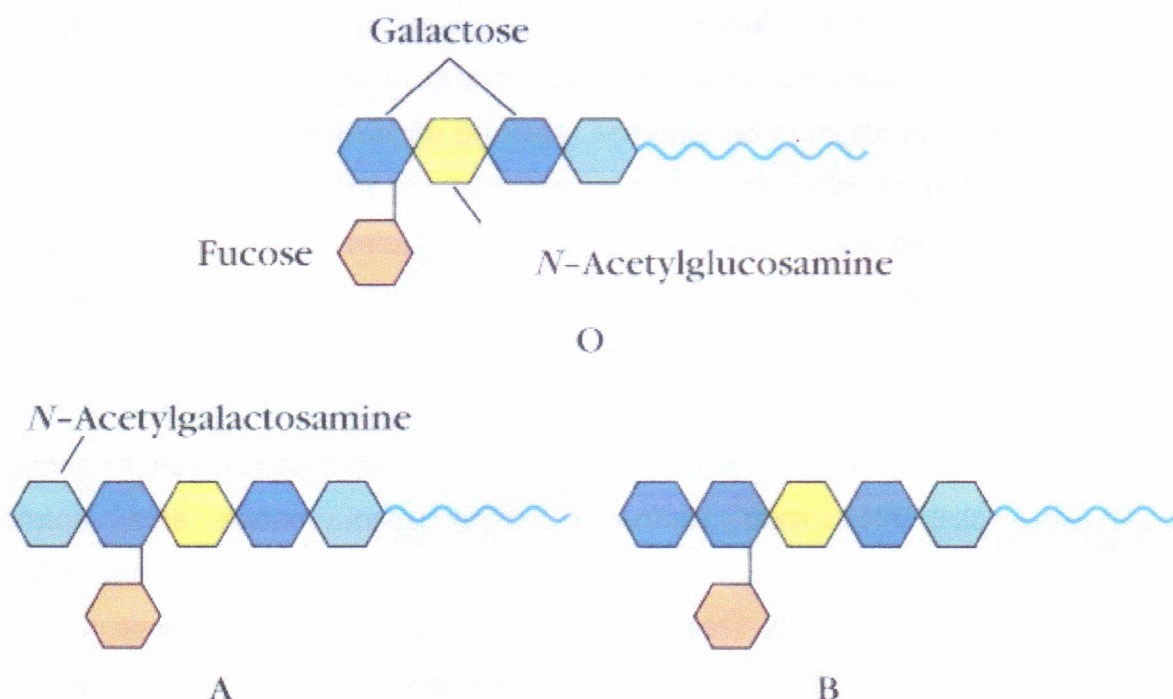


FIGURA - 3. As diferenças das estruturas de carboidratos entre os tipos sanguíneos ABO.

Quando Nowell (1960) descreveu a atividade mitogênica de lectinas sobre linfócitos humanos do sangue periférico, estudando uma das lectinas de sementes de *Phaseolus vulgaris* - PHA, um novo e importante ramo de pesquisa surgia tanto para a lectinologia quanto para a imunologia. Esta descoberta desencadeou um grande número de pesquisas nas quais lectinas vegetais, que apresentavam especificidade a diferentes tipos de carboidratos, foram utilizadas frente a diversos sistemas celulares a fim de estudar sua ação biológica

(BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; BENTO *et al.*, 1993; FERREIRA *et al.*, 1996; BARRAL-NETTO *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 1999; BARBOSA *et al.*, 2001; CAVADA *et al.*, 2001). Pouco tempo após a descoberta de Nowell, Aub *et al.* (1965) relataram que a lectina de trigo (WGA) era capaz de distinguir células normais de outras malignas dentro de um mesmo tecido, através da aglutinação específica das células transformadas.

As células têm, sobre suas superfícies, carboidratos na forma de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos. O potencial dos açúcares como moléculas de informação é muito grande, pois enquanto um peptídeo ou um oligonucleotídeo tem sua informação baseada somente no número de unidades monoméricas e sua seqüência, os açúcares a tem codificada na posição e configuração estereoquímica relativa de todos os seus carbonos assimétricos das unidades glicosídicas e na ocorrência de pontos de ramificação. No entanto, duas moléculas de um único aminoácido ou nucleotídeo só podem formar um único peptídeo ou um único dinucleotídeo (SHARON e LIS, 1989a). Pelo fato das lectinas muitas vezes detectarem estas diferenças de configuração dos carboidratos, elas seriam instrumentos poderosos para esta troca de informações entre células.

A investigação dos mecanismos envolvidos na interação célula-célula passou a ressaltar a importância dos carboidratos nos processos bioquímicos, até então vistos apenas como moléculas ricas em energia ou meros elementos prostéticos. Nos últimos 25 anos, tem havido um número crescente de evidências favorecendo o conceito de que os carboidratos são elementos determinantes de reconhecimento em uma grande variedade de processos biológicos, tanto fisiológicos quanto patológicos (VARKI, 1993; SHARON e LIS, 1995).

Além da capacidade de aglutinar células, descrita por Stilmark em 1888, em sua tese de doutorado (BEUTH *et al.*, 1995), várias outras atividades biológicas de lectinas vegetais têm sido demonstradas. Entre estas se destacam: indução da proliferação de linfócitos e da produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992); estimulação de macrófagos e liberação de

peróxido de hidrogênio (RODRIGUEZ *et al.*, 1992); indução da migração de leucócitos (BENTO *et al.*, 1993); indução da liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994); proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonensis* e reconhecimento da forma metacíclica promastigota da *Leishmania braziliensis* por *Bauhinia purpurea* (BARRAL-NETO, *et al.*, 1996; PINTO da SILVA *et al.*, 2002); indução da produção *in vivo* e *in vitro* de óxido nítrico por células peritoneais murinas (ANDRADE *et al.*, 1999); indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001); atividade antiinflamatória e pró-inflamatória de lectinas animais e vegetais (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999 e ASSREUY *et al.*, 1999); atividade analgésica (SAYYAH *et al.*, 2004) efeitos renais em rim isolado perfundido *in vitro* (TEIXEIRA *et al.*, 2001); efeitos insulino-miméticos (CAVADA *et al.*, 2003); utilização de lectinas em drug delivery (SHARMA *et al.*, 2004; BIES *et al.*, 2004) interferência em mecanismos parasitários (JACOBSON e DOYLE, 1996).

As lectinas têm se mostrado ferramentas poderosas tanto para propósitos analíticos como para pesquisas em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas relacionadas. Uma de suas maiores contribuições tem sido no esclarecimento do papel de membranas celulares e subcelulares e na bioadesão celular. Nestes estudos usam-se lectinas marcadas, quer radioativamente, quer com fluoresceína ou com imunomarcadores (RAPIN e BURGER, 1974; LIS e SHARON, 1986; BIES *et al.*, 2004).

A afinidade de lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido empregada para a identificação de microorganismos. Assim é que, *Neisseria gonorrhoea* pode ser diferenciada de outras espécies de *Neisseria* por sua aglutinação com a aglutinina de germe de trigo. Existem relatos que algumas cepas não encapsuladas de *Neisseria meningitidis*, assim como alguns meningococos são também aglutinados. Ficou demonstrado que a reação lectina-*Neisseria* era específica por açúcar e que as diferenças residiam nos carboidratos da superfície celular de diferentes cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (CURTIS e SLACK, 1981).

1.2. Cárie dental

1.2.1. Aspectos Gerais

A microbiota bucal dos humanos é altamente complexa e diversa, sendo caracterizada pela presença de cerca de 300 espécies bacterianas, além de protozoários, fungos e vírus. A diversidade anatômica existente na cavidade bucal e a interdependência entre as diferentes estruturas anatômicas são particularmente interessantes. Enquanto as superfícies mucosas são caracterizadas pela constante descamação, promovendo a rápida eliminação das bactérias aderidas, os dentes são estruturas sólidas que oferecem sítios de colonização para os microrganismos, tanto na região supragengival como na região subgengival (MARCOTTE e LAVOIE, 1998). A presença de microrganismos patogênicos na superfície dental é um dos fatores predisponentes para o desenvolvimento da cárie, que é reconhecida como uma doença infecciosa de caráter crônico, dependente da interação e associação de um hospedeiro susceptível, microrganismos cariogênicos e uma dieta rica em sacarose durante um determinado período de tempo (LOESCHE, 1986).

A cárie dental e a doença periodontal são os principais indicativos que determinam o estado fisiopatológico da cavidade bucal de um ser humano (AL IAFI e ABABNEH, 1995). Nas últimas décadas, temos acompanhado um avanço muito grande em relação à etiologia e à prevenção da cárie dentária, mas, mesmo assim, dados epidemiológicos têm demonstrado que esta continua sendo, dentro da odontologia, a doença de maior prevalência. Para Freitas (2001), é ainda um desafio complexo e árduo para a odontologia o conhecimento das condições necessárias e suficientes para o aparecimento da cárie e também o seu comportamento em indivíduos e populações, pois a doença cárie é conceituada atualmente como uma patologia de origem multifatorial. A cárie remonta aos tempos bíblicos. Foi detectada em todos os povos, em todas as raças e em todas as épocas. Nos Estados Unidos, país de elevado padrão higiênico, a cárie incide em cerca de 95% da população, e

continua sendo um problema de saúde pública, pois é também de alta prevalência em países não industrializados. Assim, a cárie dental constitui, inegavelmente, sério problema social. Através dos tempos muitas teorias sobre a sua etiologia foram levantadas, porém só em 1890 com os estudos de W.D.Miller é que se formou a base para a teoria acidogênica do desenvolvimento da cárie. Verifica-se, portanto, uma destruição progressiva dos cristais de hidroxiapatita pelos ácidos produzidos pelas bactérias, levando a uma descalcificação e posterior perda da estrutura do dente (SEOW, 1998). O conceito da cárie dentária como uma doença infecciosa e transmissível ocorreu somente após estudos na década de 50 quando Keyes publicou trabalho referente ao estudo do processo cariioso em roedores (KEYES,1960). A progressão da cárie, geralmente, ocorre de forma lenta existindo fatores do hospedeiro, que auxiliam na sua formação ou controlam o seu crescimento. Dentre estes, temos a anatomia dental e da arcada dentária, onde sulcos e fissuras profundos e o apinhamento dentário favorecem a colonização bacteriana, devido à dificuldade de higienização oral. Por outro lado, fatores como a composição e o fluxo salivar, higiene bucal e exposição ao flúor participam da regulação da progressão da doença (TAPPUNI e CHALLACOMBE, 1993).

1.2.2. Biofilme Dental

Um dos fatores etiológicos mais importantes da cárie são os microorganismos de origem bacteriana que formam um biofilme patogênico que se adere à superfície dental, de modo a produzir ácidos e produtos citotóxicos, que levam a desmineralização do esmalte dental e/ou inflamação gengival, respectivamente (MARSH, 1994). Na verdade os microrganismos não se depositam ou aderem diretamente à superfície do esmalte dental, mas se ligam a uma fina camada acelular composta por proteínas salivares e outras macromoléculas que recobrem as superfícies dentárias denominadas de película adquirida (NYVAD, 1993; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

A placa dental é, na verdade, um consórcio dinâmico constituído de múltiplas espécies bacterianas formado sobre superfícies orais (FOSTER *et al.*, 2004) (Figura 4). O biofilme bacteriano que se forma sobre a superfície do dente, apresenta uma composição bacteriana e bioquímica variável dependendo dos fatores intrínsecos e extrínsecos, podendo mudar de modo a tornar este biofilme patogênico (MARSH,1992;1994). Como citado anteriormente os microorganismos não se prendem diretamente a superfície mineralizada do dente, visto que os dentes são sempre revestidos por uma película protéica acelular denominada película adquirida. A película se forma na superfície "nua" do dente em questão de minutos. Os principais constituintes da película são as glicoproteínas salivares, as fosfoproteínas e, em menor extensão, os componentes do fluido gengival (HAY, 1995). Estudos com microscopia confocal a laser demonstram que existem no biofilme canais por onde chegam nutrientes e saem metabólitos como que formando um sistema integrado de transporte (LAURENCE e NEU,1999). Um dos principais problemas enfrentados pelos pesquisadores na área da cariologia foi obter modelos que se assemelhassem ao mecanismo desenvolvido pelas bactérias para formação do biofilme, visto que seu metabolismo destas neste consórcio é claramente diferente das células planctônicas (DAVIES, 2003).

A composição da película recebe muita atenção devido a sua função determinante na composição da microbiota inicial. Conseqüentemente, tem-se questionado se as características da superfície de diferentes materiais podem influenciar na composição protéica da película e, dessa forma, modificar o número de locais de adsorção inicial para diferentes espécies bacterianas (SONJU e GLANTZ,1975).

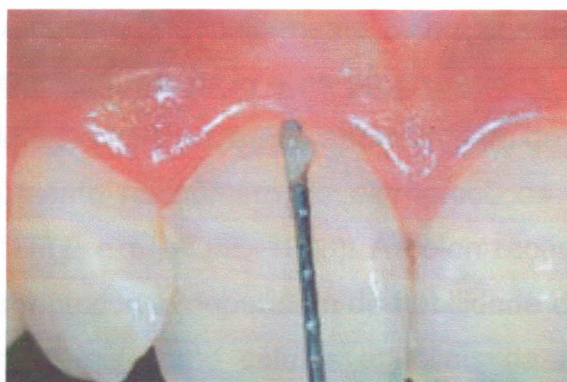


FIGURA - 4. Placa Bacteriana observada ao exame clínico com sonda periodontal milimetrada (<http://usuarios.advance.com.ar/asociacionsaludbucal>)

As bactérias interagem com a película adquirida através de uma série de mecanismos específicos, dentre eles a interação do tipo lectina, envolvendo as adesinas localizadas na superfície bacteriana e os receptores da película (GIBBONS, 1984; GIBBONS, 1996; JENKINSON e LAMONT, 1997). Em seguida, outras bactérias se aderem não apenas a película como também a bactérias pré existentes (KOLENBRANDER *et al.*, 1990).

Independente do tipo de superfície do dente (esmalte ou raiz), os colonizadores iniciais constituem uma parte selecionada da microbiota oral, principalmente os estreptococos do grupo mitis, que incluem, de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus gordonii* (BLACK *et al.*, 2004). Juntas, essas espécies de estreptococos somam 95% dos estreptococos e 56% do total da microbiota inicial (NYVAD e KILIAN, 1990). Após a colonização inicial, os microrganismos pioneiros crescem rapidamente formando colônias que ficam embebidas em uma matriz extracelular composta por componentes de origem salivar e bacteriana (BOWDEN, 1990). A seguir, relações interbacterianas contribuem para o aumento da diversidade de bactérias até atingir uma comunidade clímax em duas ou três semanas.

A complexidade da comunidade bacteriana que coloniza o biofilme dental tem dificultado a determinação das bactérias que atuam no aparecimento das lesões de cárie dental. Entretanto, há evidências consideráveis de que os

estreptococos do grupo mutans (particularmente *S. mutans* e *S. sobrinus*) e os lactobacilos estejam envolvidos no início e na progressão da cárie (LOESCHE, 1986). Estudos longitudinais revelaram que o aparecimento de cáries de esmalte é precedido por um aumento no número de estreptococos do grupo mutans (NYVAD, 1993; MARCOTTE e LAVOIE, 1998). A colonização e a persistência na cavidade oral dos estreptococos dependem da habilidade dessas bactérias a aderir a superfícies orais, tais como células epiteliais da mucosa ou placa bacteriana nos dentes (BLACK *et al.*, 2004). A atividade enzimática da neuraminidase bacteriana pode modificar os componentes da película de forma a destruir os receptores de algumas espécies, ao mesmo tempo em que cria novos receptores para outras espécies, isso, provavelmente, é um fator importante na regulação da colonização (GIBBONS *et al.*, 1980).

1.2.3. A multifatorialidade da Cárie Dental

Um dos fatores de desequilíbrio, fundamental para o aparecimento de uma placa dental cariogênica, é a dieta rica e freqüente de carboidratos fermentáveis. Esta dieta promove um aumento da proporção de estreptococos do grupo mutans e de lactobacilos, com concomitante queda de níveis de colonizadores iniciais (MINAH *et al.*, 1985). Em todas as abordagens relacionadas à etiologia da cárie, a importância da dieta é bastante discutida.

Segundo Thylstrup e Fejerskov (2001) “um grande número de estudos mostra que a dieta exerce um papel central no desenvolvimento da doença cárie”. Uma relação causal entre a exposição a carboidratos fermentáveis e o surgimento da doença cárie foi mostrada através da observação de pacientes, de animais e de observações laboratoriais *in vitro*. O estudo experimental em humanos de Vipeholm (BEZERRA e TOLEDO, 1999; BUISCHI, 2000; FREITAS, 2001; LOESCHE, 1986; STORINO, 1993; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001), concluído em 1951 e absolutamente inaceitável nos dias de hoje, estudou pacientes adultos internados em um hospital psiquiátrico do sul da Suécia submetidos a uma dieta diária com maior

ou menor quantidade de açúcar. As conclusões obtidas foram de que o aumento no número de lesões de cárie estava associado ao consumo de açúcar, na sua maioria na forma de balas e caramelos, principalmente entre as refeições.

A observação do comportamento da cárie em crianças internadas no orfanato da Hopewood House (BEZERRA e TOLEDO, 1999; BUISCHI, 2000; FREITAS, 2001; STORINO, 1993; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001), no sul da Austrália mostrou que, em função da dieta pobre em carboidratos, a prevalência de cárie entre as crianças internadas era inferior à prevalência de cárie em crianças de outras escolas da região. Outro dado importante observado foi o fato de aumentar o índice de cárie nas crianças que saíam do orfanato e eram submetidas a uma dieta sem restrição aos carboidratos. Loesche (1986), para reforçar a importância da sacarose na etiologia da cárie dentária, evidencia que o fato de a Segunda Guerra Mundial ter imposto um consumo restrito de sacarose fez com que diminuísse a incidência de cárie dentária entre os anos de 1940 a 1950, principalmente nas populações européia e japonesa. Em relação à interferência da dieta na atividade da doença cárie, sua influência poderá ser menor quando se controlar a quantidade da ingestão de alimentos açucarados e também quando se desenvolver o hábito de tornar mais longos os intervalos entre as ingestões de açúcar, dando tempo para a remineralização das zonas desmineralizadas (WEYNE e HARARI, 2001).

A cárie é também consequência direta da má higienização bucal realizada pelo paciente e se estabelece pela inter-relação entre a atividade bacteriana e o tipo de tecido envolvido (KASUGA *et al.*, 1997). Os estreptococos do grupo mutans apresentam algumas vantagens ecológicas quando da presença da sacarose no meio bucal que permitem a sua aderência e consequente colonização da superfície lisa do esmalte dental, favorecendo seu posterior acúmulo. Na década de 1930 foi demonstrado que a fermentação dos carboidratos da dieta alimentar nos depósitos microbianos provoca a formação de ácido lático, que está envolvido na desmineralização dos dentes. Esses microorganismos não só fermentam a sacarose como a partir destas sintetizam polissacarídeos extracelulares que favorecem ainda mais a adesão das

bactérias (DE STOPPELAAR *et al*, 1971; GIBBONS e VAN HOUTE, 1975; HAMADA e SLADE,1980). Esta síntese é feita por enzimas chamadas genericamente de glicosiltransferases, podendo ser sintetizados glucanos pela ação glucosiltransferases (Gtf) e frutanos pela atividade das frutossiltransferases (Ftf) (ROLLA *et al.*, 1983; HAMADA e SLADE,1980; LOESCHE,1986).

Apesar das evidências experimentais em animais e observações clinico-laboratoriais em humanos confirmarem a importância dos microorganismos na etiologia da cárie, deve ser destacado que a doença é multifatorial. Weyne e Harari (2001) reforçam a natureza multifatorial da cárie, quando dizem que a interação de vários fatores em condições críticas é condição necessária para que ela se expresse clinicamente. Além da microbiota, outros fatores são importantes, destacando-se a susceptibilidade do hospedeiro e sua dieta. Microorganismos cariogênicos podem ser freqüentemente isolados da cavidade oral de indivíduos sem cárie, revelando a importância dos demais fatores no controle do desenvolvimento da doença. Fluxo e capacidade tampão da saliva, bem como o nível de componentes antimicrobianos e anticorpos neste fluido orgânico, desempenham papel importante na regulação da microbiota e sua virulência. Além disso, o grau de mineralização do esmalte dentário e a organização dessa estrutura são aspectos fundamentais para a resistência ao ataque ácido microbiano. Os carboidratos da dieta, principalmente a sacarose, participam na nutrição e na colonização microbianas da cavidade oral, representando um fator preponderante na etiologia da cárie. A tríade de Keyes, esquema desenvolvido pelo Dr. Paul Keyes na década de 60 para estabelecer os fatores primários da cárie (KEYES, 1960), hoje em dia é apresentado modificado com a inclusão de um novo fator que é o tempo, período em que é necessário que se permaneça todos os outros fatores para que a doença ocorra (UZEDA , 2002)(Figura 5).

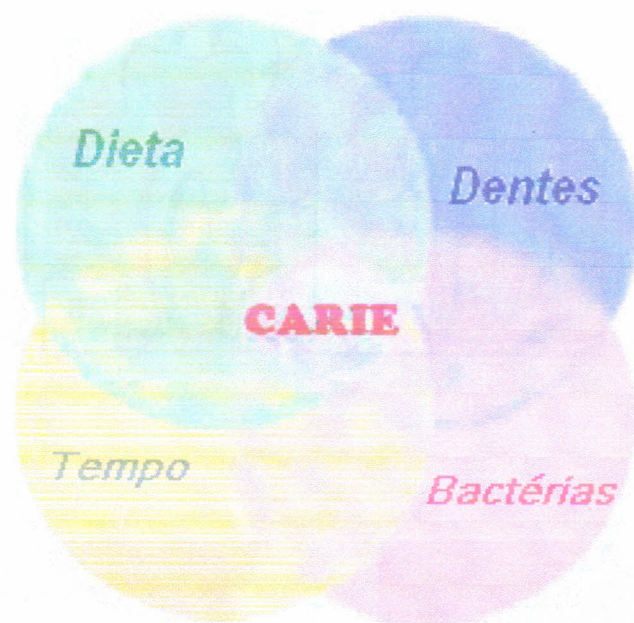
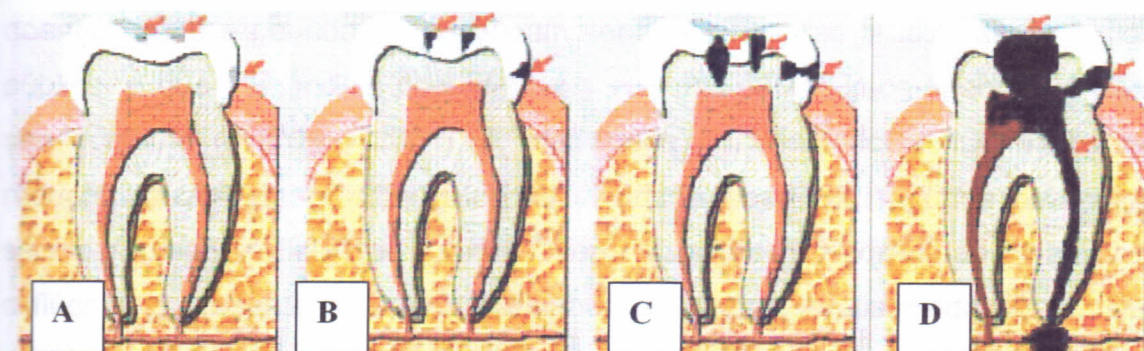


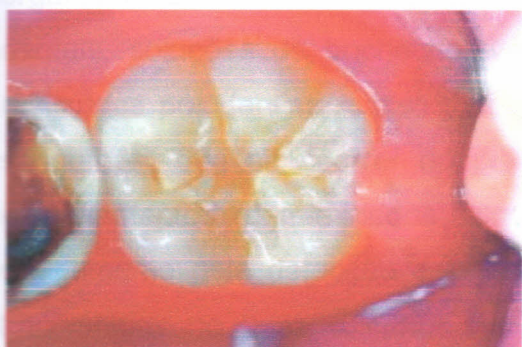
FIGURA - 5 . Modelo de Keyes Modificado

1.2.4. A progressão da Cárie Dental

A cárie é o processo de desmineralização do dente por ácidos formados através do metabolismo dos carboidratos pelas bactérias orais (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001). A atividade cariosa pode ser diagnosticada pelo surgimento de uma área esbranquiçada, opaca e rugosa, na superfície do dente, gerada pela desmineralização do esmalte. A Cárie incipiente ou mancha Branca aparece no estágio inicial da cárie, antes que se forme uma cavidade propriamente dita. Neste estágio a cárie pode ser remineralizada (Figura 6.A). Quando o ácido produzido pelas bactérias dissolve o esmalte dos dentes provocando uma pequena cavidade temos a cárie de esmalte. Até este estágio a cárie não causa dor na grande maioria dos casos (Figura 6.B). Após ultrapassar o esmalte a cárie avança mais rapidamente na dentina e passa a ter uma maior probabilidade de causar dor (Figura 6.C). Um último estágio, a cárie evolui até alcançar totalmente a polpa, causando dor e podendo originar abscessos no tecido ósseo abaixo da raiz (Figura 6.D).



No f...
Des...
Fig...



de P...

Des...

FIGURA - 6. Evolução do processo de cárie. Quadros acima: A. Mancha branca. B. Cárie de esmalte. C. Cárie de Dentina. D. Cárie envolvendo a polpa dentária.

(http://www.apcd.org.br/Biblioteca/Revista/2002/jan_fev/44.asp)

A placa bacteriana cariogênica é uma entidade organizada, proliferante, enzimaticamente ativa, capaz de se aderir a superfícies dos dentes, ocasionando as alterações patológicas da cavidade bucal. A desorganização desse consórcio bacteriano é indicada tão logo quanto possível (CIANCIO, 1992).

Nos últimos anos têm-se observado expressivos ganhos nos níveis de saúde bucal das pessoas na maioria dos países industrializados, e também entre alguns países em processo de desenvolvimento, de acordo com inúmeros estudos epidemiológicos. Vários são os fatores que contribuíram para a redução da incidência das doenças mediadas por placas bacterianas, apesar de que as

doenças cárie e periodontal continuam sendo os maiores problemas de saúde pública, e que demandam consideráveis volumes de recursos financeiros para seu combate (WEYNE, 2001). A efetividade dos dentifrícios fluoretados na redução da cárie dental começou a ser estudada a partir da segunda metade do século XX, após a Segunda Grande Guerra Mundial. Incorporado ao organismo, o flúor está presente na saliva, banhando os dentes, e associado ao esmalte dentário de maneira a torná-lo mais resistente ao "ataque" dos microrganismos. No Brasil, a administração do flúor é feita pela água de abastecimento público. Dessa maneira, o flúor "entra" no organismo de forma sistêmica beneficiando o organismo de uma forma geral. O flúor também está presente nos cremes dentais, soluções de bochecho, vernizes fluoretados e nas aplicações locais realizadas por dentistas. Isso tudo pode causar um aumento na concentração sanguínea, que se ocorrer no período de formação do dente, pode causar manchamentos denominados "fluorose". A fluorose dental se caracteriza clinicamente pela detecção de estrias esbranquiçadas, em geral horizontais e translúcidas, no esmalte, sendo sua hipoplasia causada pela ingestão excessiva de Flúor no período de calcificação dos dentes (PINTO, 2000). O período de desenvolvimento dos dentes susceptíveis a fluorose é por volta dos 22 aos 26 meses de idade da criança e para os incisivos a ingestão de Flúor é crítica até 36 meses após este período (EVANS e STAMM, 1989). O dentifrício fluoretado é a razão principal do declínio da cárie no mundo desenvolvido, mas seu uso em jovens e crianças deve ser observado para se evitar conseqüências como a fluorose, quando este método é associado à outra forma de liberação de flúor (SATO, 2001).

Assim, a cárie dental é uma doença caracterizada pela destruição localizada e progressiva dos tecidos duros do dente e está intimamente associada com a microbiota residente do biofilme dental, de modo que o seu tratamento envolve a remoção mecânica desses biofilmes (MARSH e MARTIN, 1992).

Nas últimas décadas têm sido observado mundialmente um crescente uso de produtos naturais para prevenção de doenças bucais

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade anticariogênica das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa*, e das lectinas isoladas das algas *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum*.

2.1.1. Objetivos específicos

- Verificar a possível ligação das lectinas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus*, *Vatairea macrocarpa*, *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum* à película adquirida ao esmalte através de fluorescência utilizando-se FITC associado às lectinas.
- Verificar a possível interferência das lectinas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus*, *Vatairea macrocarpa*, *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum* no processo de colonização da película adquirida através de metodologia de formação de biofilme "in vitro" utilizando-se cinco cepas bacterianas importantes no processo cariogênico: *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. oralis* e *S. mitis*.
- Verificar a possível ação antibacteriana contra *Streptococcus mutans* das lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa*.
- Verificar as possíveis alterações morfológicas, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de microscopia eletrônica de transmissão (MET), de *Streptococcus mutans* provocadas por lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Lectinas

As lectinas estudadas estão descritas na tabela 1, juntamente com sua especificidade por carboidratos, matriz cromatográfica usada no isolamento e a referência metodológica.

A etapa da pesquisa relacionada à obtenção das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus*, e *Vatairea macrocarpa*, bem como das lectinas de algas *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum*, foram realizadas no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL – LAB), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

3.2. Saliva

A saliva utilizada nos experimentos foi obtida a partir de doadores clinicamente saudáveis através da colaboração do Prof. Samuel Pessoa do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará .

Amostras de saliva não estimulada foram coletadas em frascos estéreis imersos em gelo e imediatamente submetidas a centrifugação a 10.000g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado em filtros 0,22µm (Millipore) e denominado de saliva clarificada. Para os ensaios utilizamos um conjunto (denominado de pool) de saliva clarificada contendo material de 5 pacientes fixos. Isso além de permitir uma quantidade maior de sítios de ligação na película, uniformizou a formação da PAE (Película adquirida do esmalte), o que diminuiu a variação da composição salivar da película, excluindo uma variável indesejada nesses estudos (GIBBONS *et al.*, 1986; LAMKIM *et al.*, 2001).

TABELA - 1. Lista das espécies das quais foram isoladas as lectinas utilizadas nos experimentos juntamente com sua especificidade por carboidrato, matrix cromatográfica usada no isolamento e referência da metodologia.

Espécie	Especificidade	Isolamento/matrix	Referência Utilizada no Isolamento
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Glicose/manose	Sephadex G50	MOREIRA e CAVADA, 1984.
<i>Dioclea violacea</i>	Glicose/manose	Sephadex G50	MOREIRA <i>et al.</i> , 1996.
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Glicanos complexos	DEAE	AINOUZ <i>et al.</i> , 1995
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Glicanos complexos	DEAE	AINOUZ <i>et al.</i> , 1995
<i>Vatairea macrocarpa</i>	Galactose	Goma de guar	CAVADA <i>et al.</i> , 1998
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	N acetil D glicosamina	Quitina/DEAE	SÉRVULO, 2004

3.3. Bactérias

Os microorganismos foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) e estão descritos na tabela abaixo:

TABELA - 2. Espécie e cepa dos microorganismos utilizados

Microorganismo Espécie	Cepa
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 6715
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10556
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 182
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 903

3.4. Formação de película adquirida do esmalte (PAE) em pérolas de hidroxiapatita para ensaio de marcação de película através de lectina associada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Para a formação da película adquirida (PAE) foi utilizado 5mg de pérolas de hidroxiapatita (60 μ m) e em seguida adicionou-se 125 μ l do pool de saliva clarificada de cinco pacientes. A amostra permaneceu por uma hora sobre agitação constante à temperatura ambiente. Em seguida, as pérolas foram lavadas com tampão PBS 0,1M pH 7,2 e utilizadas nos experimentos (LAMKIM *et al.*, 2001).

3.5. Associação de lectinas com FITC (Isotiocianato de fluoresceína)

Alíquotas contendo 1mg de lectina acrescida do monossacarídeo inibidor (0,1M), exceto as lectinas de algas que não foram associadas a nenhum açúcar inibidor previamente, foram dissolvidas em 2ml de solução de

conjugação (1,5ml de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,2M pH 9,3, contendo 0,5ml de etilenoglicol). Após rápida agitação em vórtex foi adicionado à mistura (lectina/açúcar e solução de conjugação) 500µl de uma solução de FITC em etilenoglicol (0,05mg/ml) e esta última foi submetida a agitação por 5h a 4°C e ao abrigo da luz. Após incubação, a fração contendo lectina/FITC foi separada da FITC não conjugada por meio de cromatografia de exclusão molecular em coluna PD 10 (Pharmacia LKB – 9,0 ml), previamente equilibrada com água Milli-Q saturada com N-butanol 5% e com fluxo contínuo mantido por força da gravidade. Imediatamente antes da cromatografia, 450µl da solução de equilíbrio foram adicionados a amostra e, em seguida, aplicada a coluna. O pico I, que corresponde a fração lectina/FITC foi retirado com 3,5ml de solução N-butanol 5%, enquanto que a FITC não conjugada foi eluída no Pico II com 10ml da mesma solução.

3.6. Ensaio de marcação de película adquirida (PAE) com lectinas associadas com FITC

Após o tratamento das pérolas de hidroxiapatita com saliva (ver item 3.4), adicionou-se 1ml de cada solução das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus*, *Vatairea macrocarpa*, *Bryothamnion seaforthii* ou *Bryothamnion triquetrum* marcada com FITC (100µg/ml) e colocou-se as pérolas sob agitação por uma hora. Após esse tempo as pérolas foram lavadas duas vezes com tampão PBS 0,1M pH 7,2 sendo, em seguida, observadas ao microscópio de fluorescência modelo Olympus System Microscope Model BX60. Para a tentativa de reversão dos efeitos foi utilizada uma solução de lectina (100µg/ml) conjugada com açúcar específico (0,1M) mantidos previamente em estufa a 37°C por 30 minutos. Os seguintes carboidratos foram utilizados: Para lectina de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* utilizou-se manose; Para lectina de *Lonchocarpus sericeus* utilizou-se N acetil glicosamina; Para lectina de *Vatairea macrocarpa* utilizou-se

galactose e para lectina de *Bryothamnion seaforthii* ou *Bryothamnion triquetrum* utilizou-se mucina de porco (1mg/ml).

O Controle negativo foi realizado utilizando-se somente solução de FITC na concentração de 5 μ g/ml deixada em contato com as pérolas de hidroxiapatita/ PAE por uma hora e em seguida lavada com PBS 0,1M pH 7,2 e observada ao microscópio de fluorescência.

Especificamente para a lectina isolada da alga *Bryothamnion seaforthii* realizou-se um teste de termoestabilidade mantendo-se uma solução dessa lectina (100 μ g/ml) aquecida a 100°C e retirando amostra para os testes nos seguintes tempos 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos e 60 minutos. O intuito desse teste foi de tentar ratificar através desse método a termoestabilidade dessa lectina já descrita anteriormente (AINOUZ *et al.*, 1995).

3.7. Ensaio de inibição de adesão bacteriana através do tratamento da película adquirida (PAE) com lectinas vegetais

As amostras contendo os microrganismos foram crescidas em 3ml de Todd Hewitt Broth (Difco) overnight a 37°C em uma atmosfera de 10% CO₂, centrifugadas (5000 rpm) por 5 minutos e lavadas duas vezes com tampão PBS 0,1M pH 7,2 sendo ressuspendidas no último ajustando-se a concentração a 10⁶ CFU/ml (A580nm =1 /10⁶ CFU/ml) .

A saliva clarificada de cinco pacientes (100 μ l) foi transferida para a placa de poliestireno (ELISA) estéreis com fundo em U e incubadas por 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com água destilada estéril para retirada do excesso de saliva. Adicionou-se aos poços 100 μ l de solução de cada uma das seis lectinas (100 μ g/ml) testadas ou das soluções contendo lectina associada com seu respectivo açúcar específico (0,1M) e incubadas por 1 hora a 37°C. No caso das lectinas de algas, por conta da sua especificidade a carboidratos complexos, a tentativa de reversão foi realizada utilizando uma solução de 1mg/ml de mucina de porco. As placas foram lavadas por três vezes com água destilada estéril e em seguida foram

adicionadas às amostras (100 μ l) dos respectivos microrganismos (n = 6) e novamente incubadas a 37°C por 1 hora.

Foram realizados dois controles negativos de inibição. No primeiro utilizou-se em vez das soluções de lectinas somente uma solução salina 0,15M e no segundo controle foi realizado utilizando uma solução contendo 1mg/ml de albumina humana.

A adesão das bactérias foi quantificada segundo a metodologia descrita por OTOOLE e KOLTER, em 1998. Consiste numa coloração através de cristal de violeta 1%. Para tanto, foi adicionado 100 μ l de cristal de violeta 1% em cada poço e deixado por 30 minutos. As placas, nesse estágio, foram lavadas três vezes com água destilada estéril e colocadas sob temperatura ambiente por 1 hora. Após esse tempo em cada poço foi adicionado 200 μ l de álcool metílico e, após 1 hora, 100 μ l da suspensão foi transferida para uma segunda placa de ELISA de fundo chato seguido de leitura a 575nm em um leitor de ELISA. Os dados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e Bonferoni t test para comparar os grupos controles (salina e albumina) e os grupos tratados.

3.8. Determinação da atividade antibacteriana

3.8.1. Atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*

Linhagens de bactérias de *Streptococcus mutans* crescidas em meio BHI (Infusão de Cérebro e Coração – DIFCO) 24 horas antes, foram centrifugadas (5000 rpm/5min), coletadas e resuspensas em tampão PBS 0,1M, pH 7,4. Estas aliquotas de suspensão bacteriana foram ajustadas até uma concentração mãe de 10⁸ UFC/ ml (A650nm = 3). Esta suspensão inicial previamente ajustada foi então diluída a uma concentração bacteriana de 1 x 10⁴UFC/ ml (concentração final) que foi usada para incubação com as lectinas na concentração de 250 μ g/ml, seguindo então a uma incubação de 30 minutos a 37°C. Após o tempo de incubação cerca de 250 μ l (concentração final) desta suspensão foi

então aplicada sobre placas de petri com ágar sangue e então procedeu-se uma incubação, em condições de escuro, em anaerobiose (via injeção de CO₂ e retirada completa o ar da câmara de incubação, dando uma concentração final de CO₂ na câmara de 10%) a 37°C para possibilitar o crescimento das colônias de *Streptococcus mutans*, por 72 horas e analisadas posteriormente por contagem de colônias de bactérias. Os dados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e Bonferoni t test para comparar os grupos (n=6).

3.8.2. Microscopia eletrônica de Transmissão

Neste protocolo experimental para observação das alterações morfológicas em microscopia eletrônica de transmissão foram feitas com bactérias sem a presença e na presença das lectinas estudadas. As amostras de bactérias foram imersas em fixador (Glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4), por 12 horas a 4°C, lavadas três vezes por 10 min com tampão A (Fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4), e fixadas com 1% de tetróxido de ósmio (Agar Scientific Ltd) em tampão A, por 2 horas a 4°C. O material então foi desidratado com uma concentração crescente de etanol e embebida em resina Epon e a polimerização foi realizada a 60°C por 48 horas. Os blocos obtidos foram aparados e cortados em um ultramicrotomo (Dupont-Sorvall MT2) e as fatias obtidas foram montadas e coradas com Acetato de Uracil 2% por 15 minutos, seguido por um banho de 2,6% de Citrato (Agar Scientific) por mais 15 minutos. As amostras foram então analisados em microscopia eletrônica de transmissão LEO 906 trabalhando entre 40 e 100kV.

3.8.3 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura onde foram examinadas após o tempo de incubação das bactérias com ou sem lectinas. Após o tempo de incubação as amostras de bactérias foram fixadas a

4°C em 0.1M de tampão cacodilato pH 7,4, contendo 2,5% de glutaraldeído por 12 horas para serem preparadas em microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,4. As amostra de bactérias fixadas foram colocadas em filtros de policarbonato (tamanho de poro: 1µm, Millipore) e foram "lavadas" com tampão de Cacodilato 0,1M e desidratadas com soluções crescentes de etanol. As amostras foram então cobertas com uma fina película de ouro usando um Sputter Coater BALZERS SCD 050. As análises de microscopia eletrônica de varredura foram feitas usando microscópio eletrônica de varredura JSM-5800LV-JEOL.

4. RESULTADOS

4.1. Resultado do Ensaio de marcação de película adquirida (PAE) com lectinas associadas com FITC

O Controle negativo deste ensaio é composto por película de saliva sobre pérola de hidroxiapatita tratada com solução de FITC sem lectina associada e apresenta-se sem nenhum padrão de marcação como o esperado (Figuras 7 e 8).

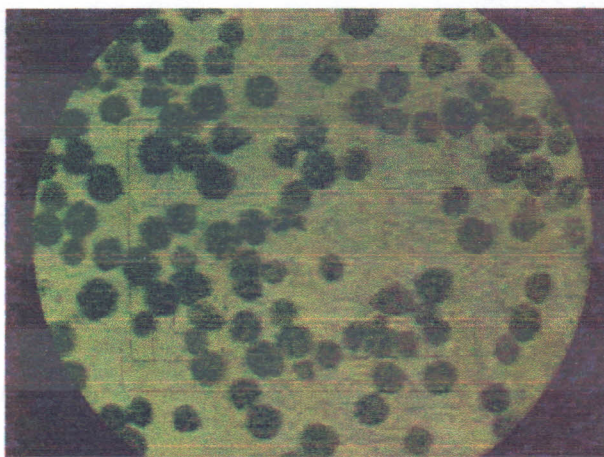


FIGURA - 7. Visualização em microscópio de fluorescência do controle negativo do ensaio de marcação de película adquirida no aumento de 100x.

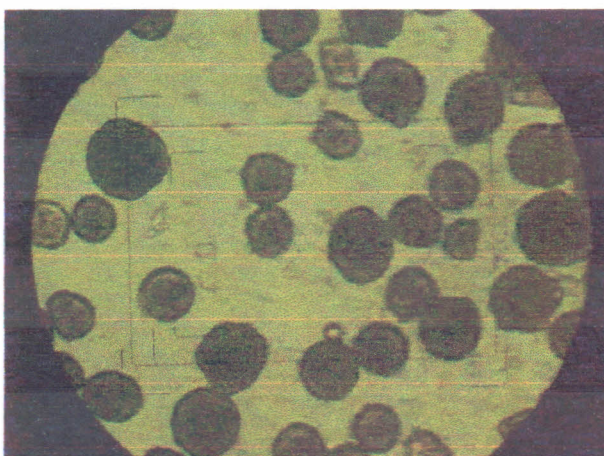
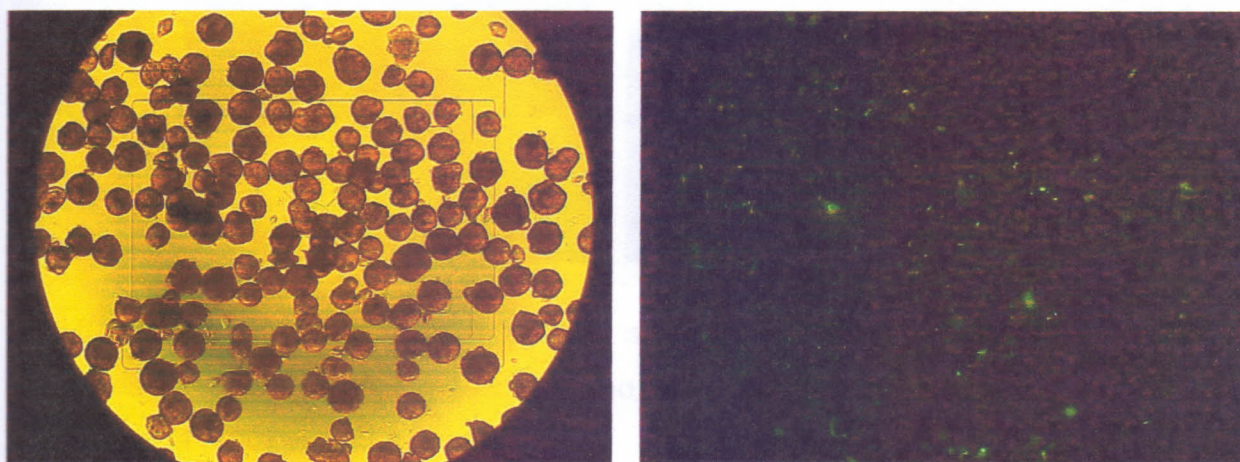


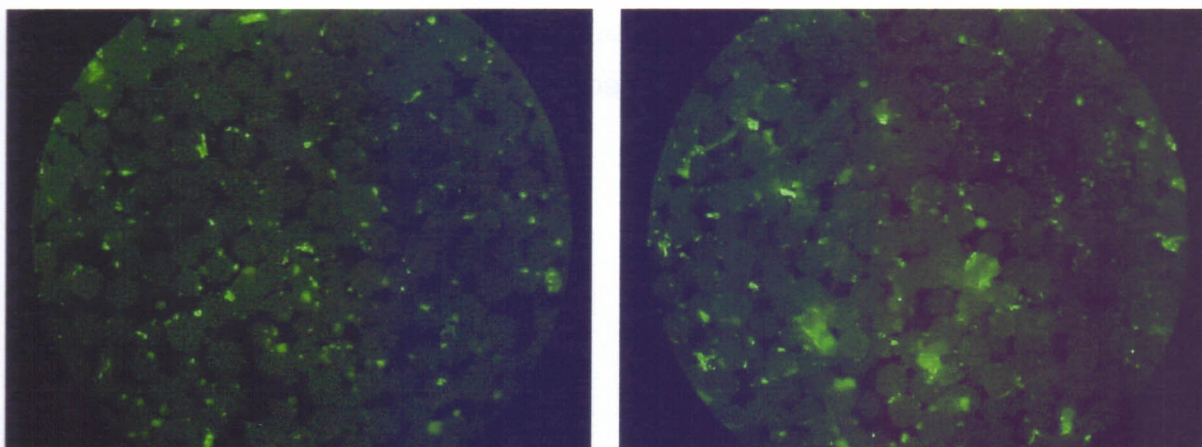
FIGURA - 8. Visualização em microscópio de fluorescência do controle negativo do ensaio de marcação de película adquirida no aumento de 200x.

A lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) possui um padrão de marcação de película adquirida bastante irregular mostrando-se evidente somente em alguns pontos da imagem tomando como referência o controle (Figuras 9 e 10).



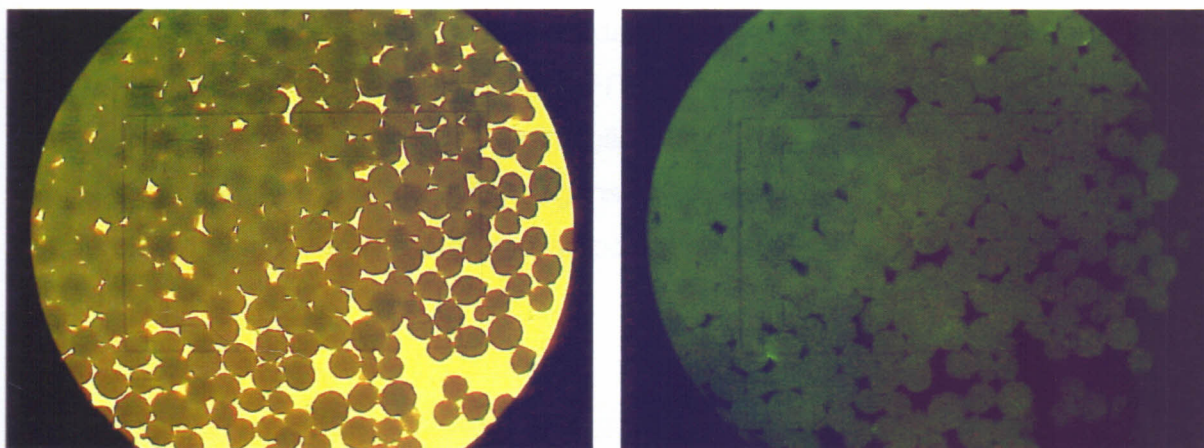
FIGURAS - 9 e 10. Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* associada ao FITC. Na Figura 9 (esquerda) a visualização é realizada ao microscópio óptico (100x) e na Figura 10 (direita) a visualização é realizada ao microscópio de fluorescência (100x).

A lectina de sementes de *Dioclea violacea* (DVL) apresentou uma marcação de película bastante irregular assemelhando-se a marcação obtida com a lectina ConBr, entretando, as pérolas foram melhor evidenciadas, como pode-se verificar nas figuras 11 e 12.



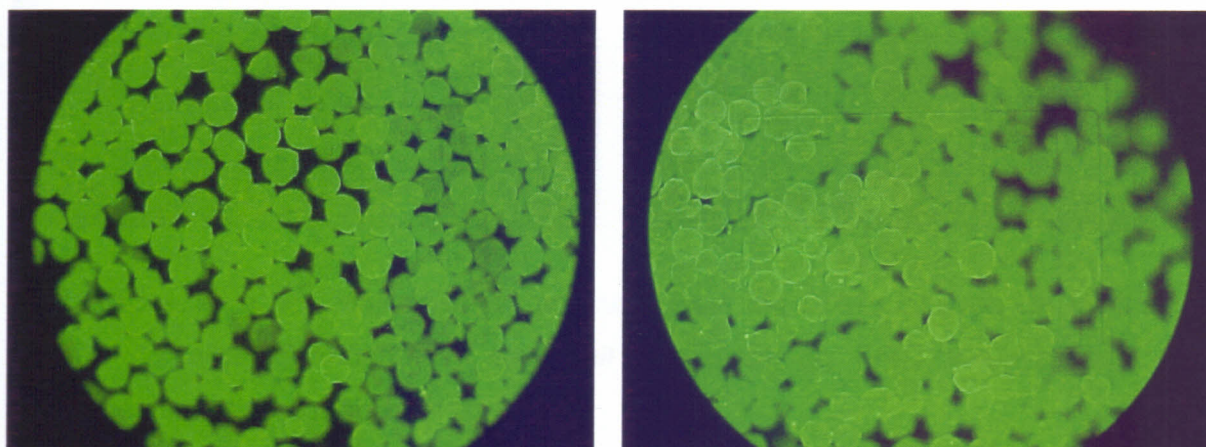
FIGURAS - 11 e 12. Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Dioclea violacea* associada ao FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x).

A lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* mostrou um aspecto de marcação muito mais uniforme do que as lectinas DVL e ConBr, entretanto, com menor intensidade (Figuras 13 e 14).



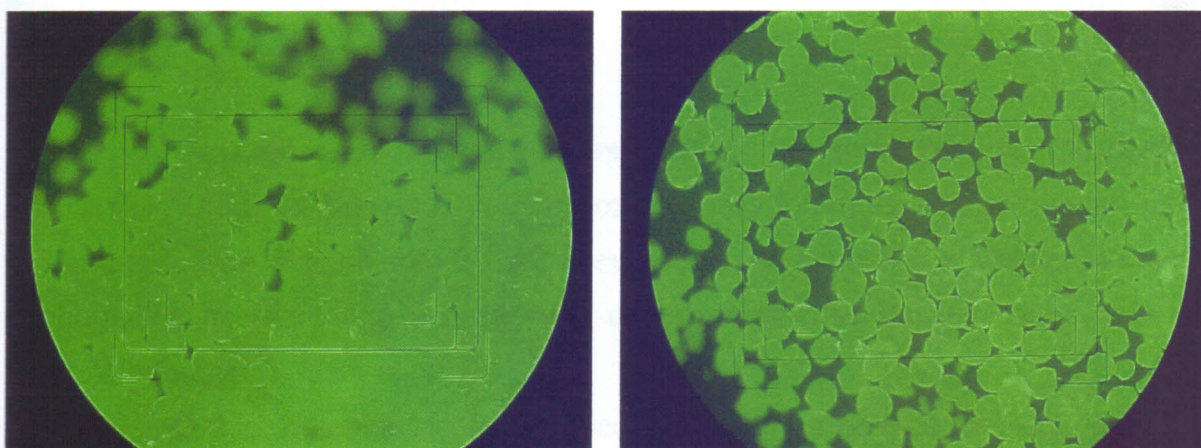
FIGURAS - 13 e 14. Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* associada ao FITC. Na Figura 13 (esquerda) a visualização é realizada ao microscópio óptico (100x) e na Figura 14 (direita) a visualização é realizada ao microscópio de fluorescência (100x)

A lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, dentre as lectinas de leguminosas, foi a que mostrou maior capacidade de ligação à película adquirida como observa-se nas figuras 15 e 16.

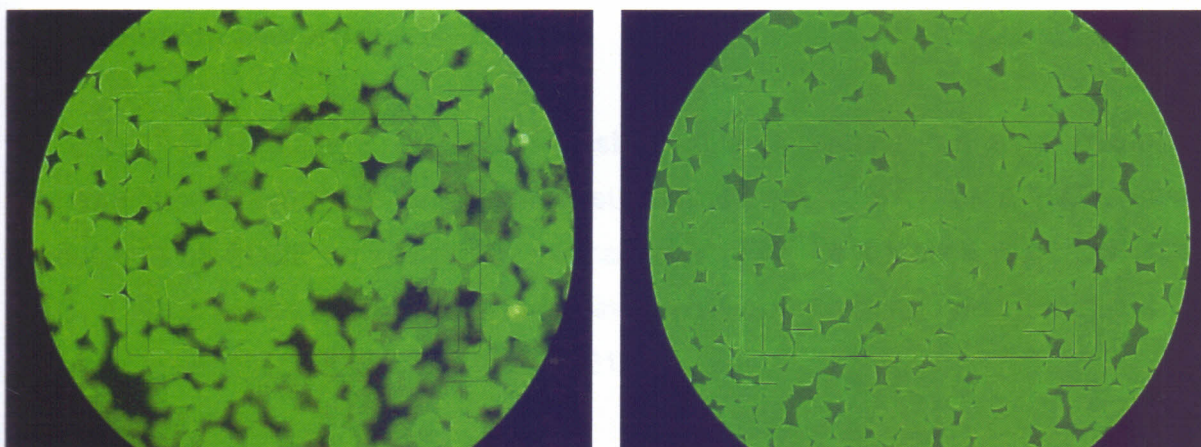


FIGURAS - 15 e 16. Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* associada ao FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x).

As lectinas de algas marinhas das espécies *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum* associadas ao FITC foram, dentre as testadas, as que possuíram a maior capacidade de marcação mostrando um padrão fluorescência forte e extremamente uniforme. Em alguns casos fica evidente uma aglutinação das pérolas de hidroxiapatita promovidas por essas lectinas (Figuras 17, 18, 19 e 20).



FIGURAS - 17 e 18. Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina isolada da alga *Bryothamnion seaforthii* associada ao FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x).



FIGURAS - 19 e 20. Marcação de película adquirida (PAE) através de lectina isolada da alga *Bryothamnion triquetrum* associada ao FITC visualizada ao microscópio de fluorescência (100x).

4.2. Resultado da reversão do efeito das lectinas através da prévia associação com carboidratos específicos, no ensaio de marcação de película adquirida (PAE)

Os efeitos de marcação das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea* e *Vatairea macrocarpa* foram revertidos quando pré incubou-se essas lectinas com 0,1M de seus açúcares específicos. Verifica-se que nenhum tipo de marcação é observado assemelhando-se nesses casos com o controle negativo.

O Efeito de marcação de película adquirida a pérolas de hidroxiapatita evidenciadas por lectinas de sementes de *Lonchocarpus sericeus* não foi revertido na presença de 0,1M de N acetil glicosamina.

As lectinas de algas marinhas *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum* não tiveram seus efeitos de marcação revertidos através da pré-incubação com mucina de porco.

O resumo das marcações e das inibições estão descritas na tabela 3.

4.3. Resultado do teste de termoestabilidade da lectina de alga marinha *Bryothamnion seaforthii*

O Resultado do teste mostrou que a lectina de alga marinha *Bryothamnion seaforthii* é termoestável suportando até 20 minutos a 100°C sem perder sua atividade no ensaio de marcação de PAE com lectina marcada com FITC. A partir desse tempo a atividade diminui até que no tempo de 60 minutos já notamos ausência de marcação (Figura 21).

4.4. Resultado do ensaio de inibição de adesão bacteriana através do tratamento da película adquirida (PAE) com lectinas

Os dados obtidos foram expressos nas figuras 22, 23, 24, 25 e 26. e nas tabelas 4, 5, 6, 7 e 8. Cada uma dessas figuras ou tabelas relaciona a ação das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus*,

TABELA - 3. Grau de marcação de película adquirida (PAE) através das lectinas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus*, *Vaitarea macrocarpa*, *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum* quando incubadas diretamente em solução juntamente com as pérolas cobertas com PAE (Coluna 1) ou quando pré incubadas com seus respectivos açúcares específicos ou Mucina, no caso das lectinas de algas marinhas.(Coluna 2).

	Lectina	Lectina + Carboidratos Específicos
<i>Canavalia brasiliensis</i>	+	-
<i>Dioclea violacea</i>	+	-
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	+++	+++
<i>Vaitarea macrocarpa</i>	++	-
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	+++	+++ *
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	+++	+++ *

Legenda: (-) Sem marcação; (+) Marcação irregular; (++) Marcação uniforme; (+++) Marcação forte e uniforme.

* Mucina (1mg/ml)

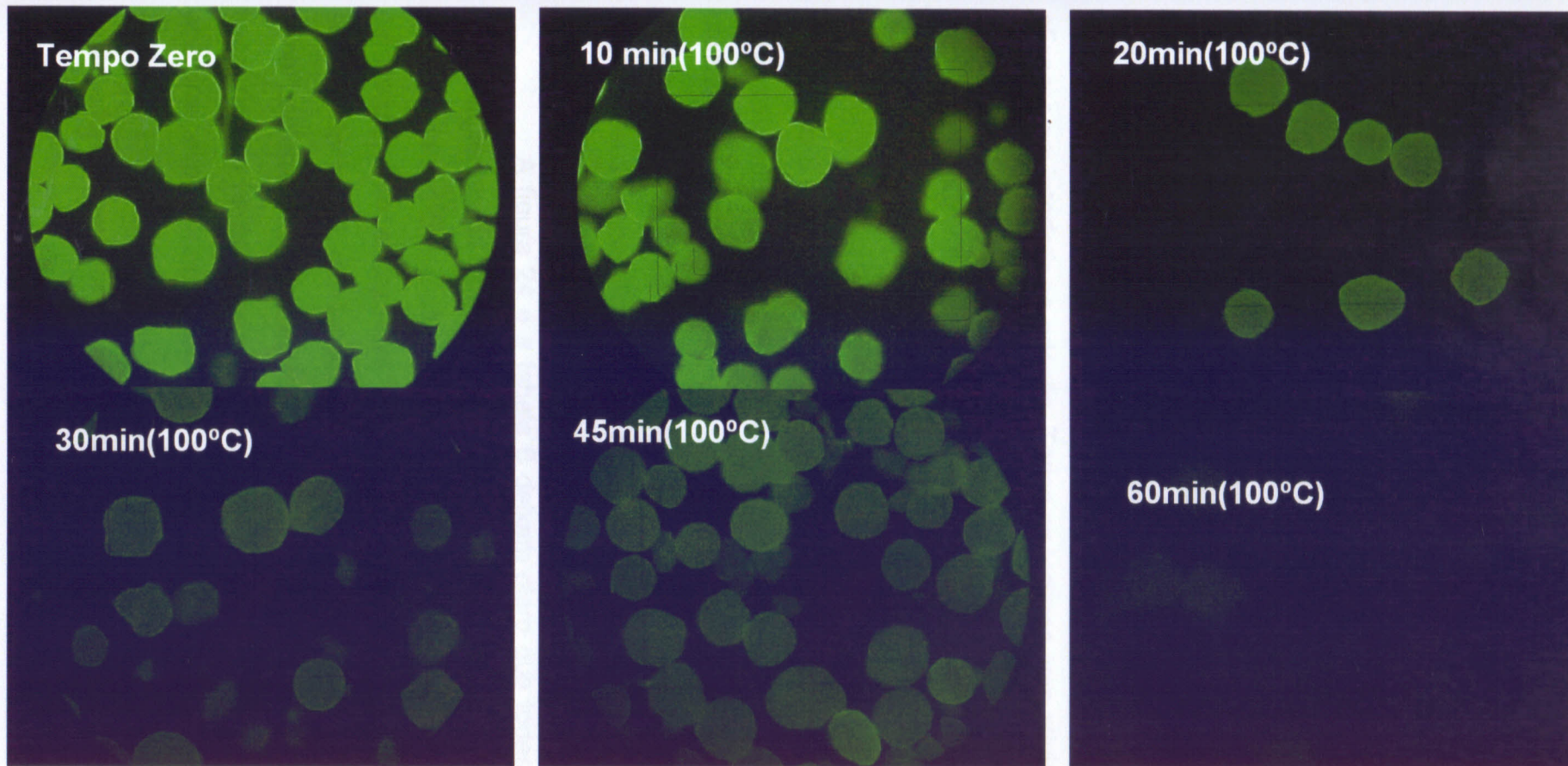


FIGURA - 21. Evolução da marcação de película adquirida usando-se lectina da alga *Bryothamnion seaforthii* em função do tempo de fervura.

Vatairea macrocarpa, *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum* sobre a inibição da adesão de cada cepa bacteriana prevista no estudo: *Streptococcus sanguis*; *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*; *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*.

Na figura 22 e na tabela 4 observamos que as todas as lectinas, excetuando-se a lectinas de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, foram eficazes em inibir a adesão de *S.sanguis* à película adquirida em relação ao controle salina. Com relação ao controle com albumina todas foram efetivas excetuando-se a BTL e LSL. A Lectina mais eficaz, entretanto, foi a lectina DVL, seguida da lectina ConBr e BSL. As lectinas BTL e VML também se mostraram estatisticamente eficazes em interferir na adesão. Todas as lectinas com atividade contra a adesão de *S. sanguis* tiveram seus respectivos efeitos revertidos através da pré incubação com seus açúcares específicos ou mucina de porco (1mg/ml) , no caso das lectinas de algas.

A figura 23 e na tabela 5 mostram a ação das lectinas na inibição da adesão se *S.oralis* a PAE. As lectinas ConBr, DVL e BSL foram estatisticamente eficientes em inibir a adesão dessa bactéria em relação aos dois controles utilizados. As lectinas BTL, VML e LSL não foram capazes de inibir a adesão dessa cepa a PAE. Todas as lectinas com atividade contra a adesão de *S.oralis* tiveram seus respectivos efeitos revertidos através da pré incubação com seus açúcares específicos ou mucina, no caso das lectinas de algas.

A figura 24 e a tabela 6 deixam claro que todas as lectinas testadas foram eficientes na inibição da adesão de *S. mitis* a película adquirida do esmalte em relação aos controles utilizados, excetuando-se a lectina VML que somente foi estatisticamente eficaz com relação ao controle com salina. A lectina mais eficiente foi a DVL que mostrou-se capaz de inibir em até 99,3% a adesão dessa cepa bacteriana. Todas as lectinas com atividade contra a adesão de *S. mitis* tiveram seus respectivos efeitos revertidos através da pré incubação com seus açúcares específicos ou mucina, no caso das lectinas de algas. A reversão do efeito de LSL, uilizando-se LSL juntamente com N acetil glicosamina, revertou o efeito e foi estatisticamente diferente do controle com solução de albumina.

Na figura 25 e na tabela 7 verificamos que a ConBr é a mais efetiva na inibição da adesão de *S. sobrinus* a PAE, entretanto, assemelha-se muito ao efeito da DVL nesta bactéria. As lectinas de algas são também efetivas com relação aos controles, salina e albumina, porém em menor grau que as lectinas anteriormente citadas. A lectina LSL também mostra eficácia, em relação ao controle com salina, na inibição da adesão, entretanto em menor grau que todas as outras. Já a lectina de VML não apresentou nenhum efeito na inibição da adesão de *S. sobrinus* a PAE. Todas as lectinas com atividade contra a adesão de *S. sobrinus* tiveram seus respectivos efeitos revertidos através da pré incubação com seus açúcares específicos ou mucina, no caso das lectinas de algas.

A figura 26 e a tabela 8 apresenta o efeito das seis lectinas testadas nesse modelo sobre a inibição da adesão de bactérias da espécie *S. mutans*. As lectinas ConBr, DVL e BSL apresentaram efeito estatisticamente comprovado com relação aos dois controles utilizados no ensaio. A lectina LSL foi efetiva somente em relação ao controle com solução salina. As lectinas VML e BT não foram eficazes em inibir a adesão de *S. mutans* a PAE. Todas as lectinas com atividade contra a adesão de *S. mutans* tiveram seus respectivos efeitos revertidos através da pré incubação com seus açúcares específicos ou mucina, no caso das lectinas de algas a exceção de LSL onde o N acetil glicosamina não promoveu reversão do efeito.

4.5. Resultado da atividade antibacteriana de lectinas vegetais contra *S. mutans*

Observamos que as lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa* foram capazes de diminuir a viabilidade de colônias da bactéria *S. mutans*. A lectina mais eficaz foi a DVL seguida de LSL e ConA. A lectina que menos inibiu a viabilidade das colônias foi a ConBr mas ainda assim 50% das colônias não vingaram na presença desta proteína.

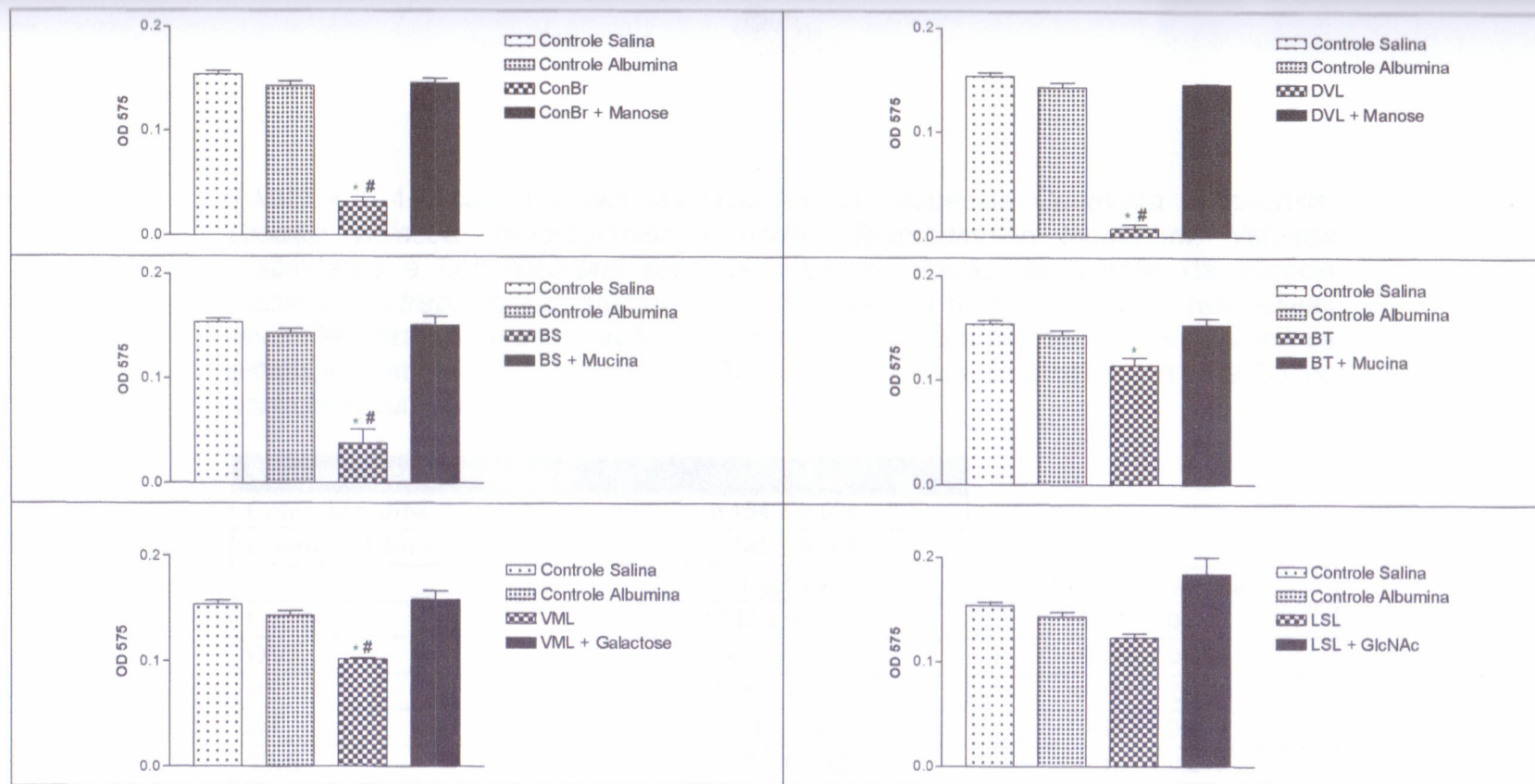


FIGURA - 22. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus sanguis* a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. P<0,01. (n = 6)

TABELA - 4. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus sanguis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. P<0,01.

<i>Streptococcus sanguis</i>		ABS 575 nm
Controle Salina		0,154 ± 0,006
Controle Albumina		0,143 ± 0,008
	Lectina	Lectina + Açúcar
ConBr	0,032 ± 0,008 ^{*#}	0,146 ± 0,008
DVL	0,008 ± 0,007 ^{*#}	0,146 ± 0,001
BS	0,038 ± 0,023 ^{*#}	0,151 ± 0,015
BT	0,114 ± 0,013 [*]	0,153 ± 0,010
VML	0,102 ± 0,002 ^{*#}	0,158 ± 0,015
LSL	0,123 ± 0,007	0,184 ± 0,067

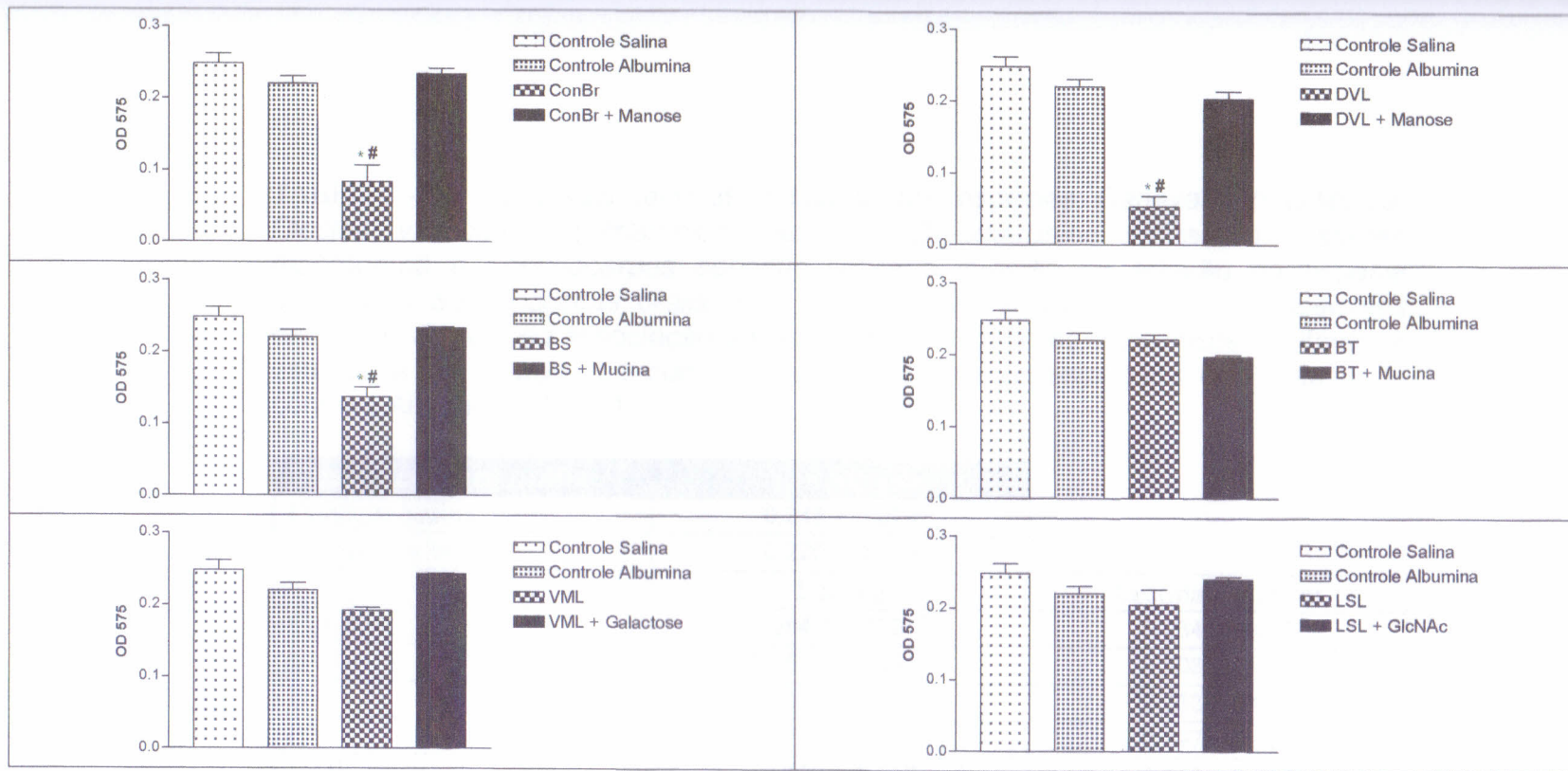


FIGURA - 23. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus oralis* a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. $P < 0,01$. (n = 6)

TABELA - 5. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus oralis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. P<0,01.

<i>Streptococcus oralis</i>		ABS 575 nm
Controle Salina		0,248 ± 0,024
Controle Albumina		0,220 ± 0,018
	Lectina	Lectina + Açúcar
ConBr	0,084 ± 0,039*#	0,234 ± 0,013
DVL	0,053 ± 0,025*#	0,203 ± 0,018
BS	0,137 ± 0,024*#	0,233 ± 0,003
BT	0,221 ± 0,011	0,197 ± 0,005
VML	0,192 ± 0,007	0,243 ± 0,002
LSL	0,204 ± 0,037	0,240 ± 0,005

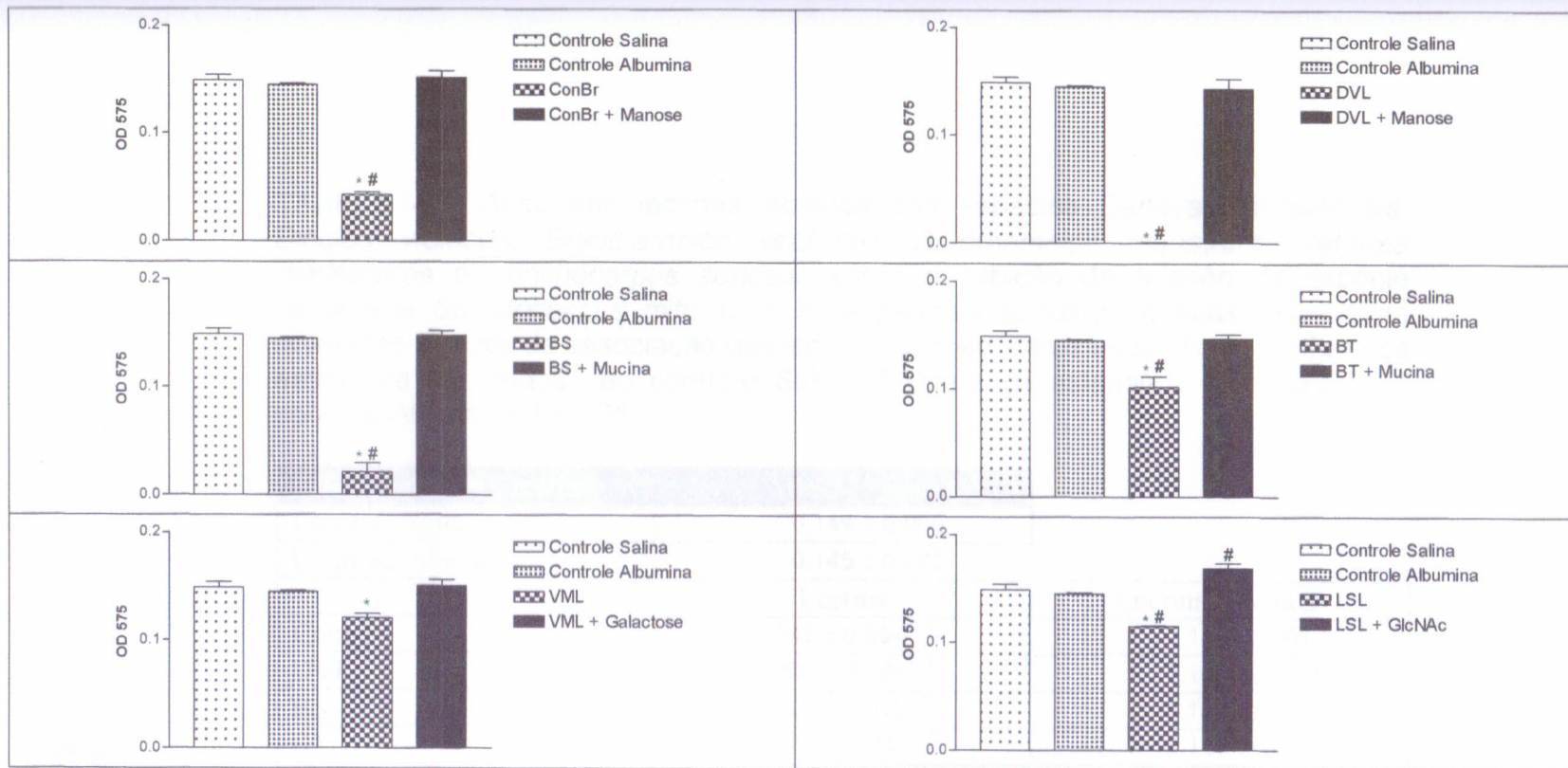


FIGURA - 24. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus mitis* a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. $P < 0,01$. (n = 6)

TABELA - 6. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus mitis* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. P<0,01.

<i>Streptococcus mitis</i>		ABS 575 nm
Controle Salina		0,149 ± 0,009
Controle Albumina		0,145 ± 0,002
	Lectina	Lectina + Açúcar
ConBr	0,043 ± 0,004 *#	0,152 ± 0,010
DVL	0,000 ± 0,001 *#	0,143 ± 0,016
BS	0,021 ± 0,015 *#	0,148 ± 0,007
BT	0,102 ± 0,017 *#	0,147 ± 0,006
VML	0,121 ± 0,006 *	0,151 ± 0,009
LSL	0,115 ± 0,001 *#	0,169 ± 0,007 #

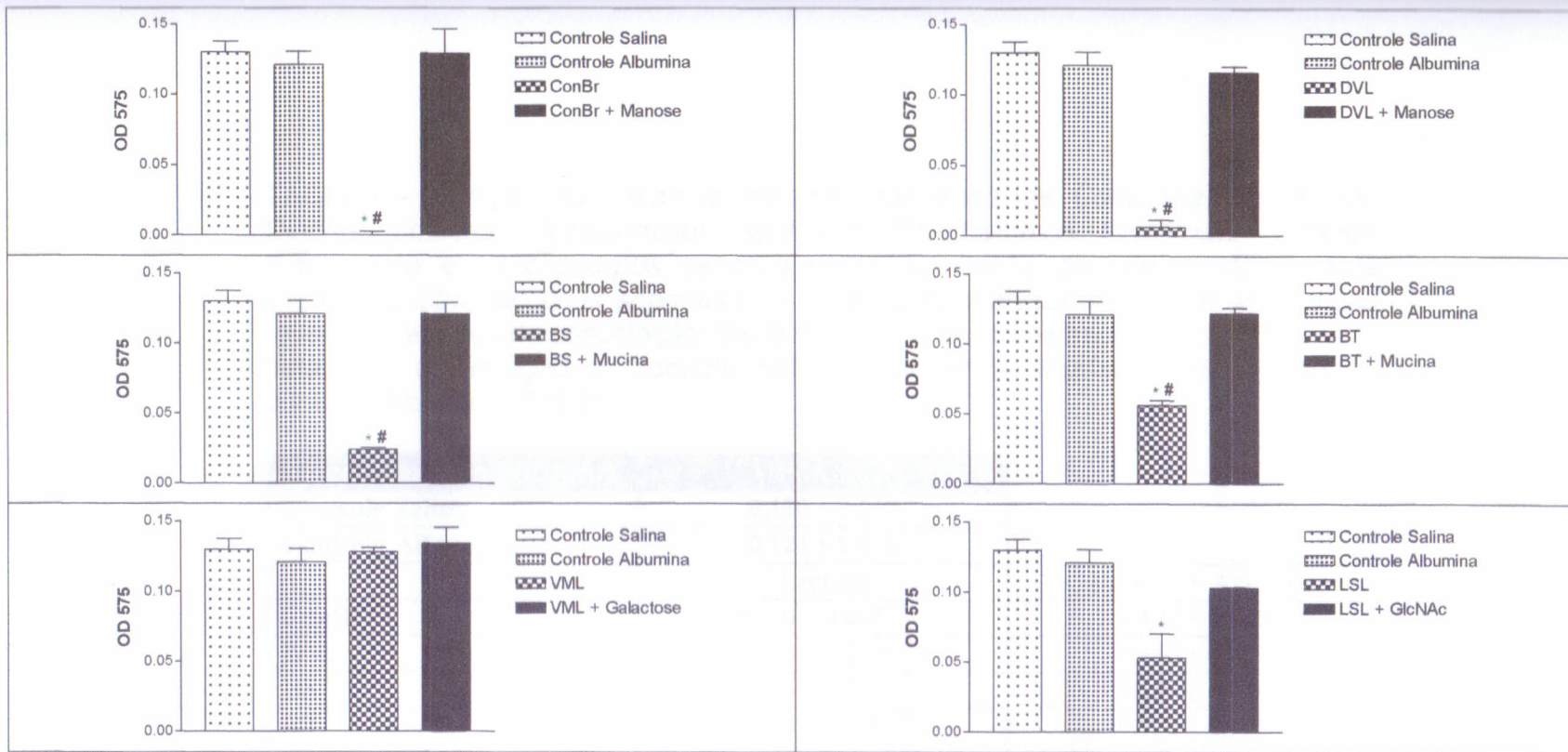


FIGURA - 25. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus sobrinus* a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. $P < 0,01$. (n = 6)

TABELA - 7. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus sobrinus* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. P<0,01.

<i>Streptococcus sobrinus</i>	ABS 575 nm	
Controle Salina	0,130 ± 0,013	
Controle Albumina	0,121 ± 0,016	
	Lectina	Lectina + Açúcar
ConBr	0,000 ± 0,005 ^{*#}	0,129 ± 0,058
DVL	0,006 ± 0,009 ^{*#}	0,116 ± 0,007
BS	0,024 ± 0,002 ^{*#}	0,121 ± 0,014
BT	0,056 ± 0,006 ^{*#}	0,122 ± 0,006
VML	0,128 ± 0,005	0,134 ± 0,020
LSL	0,053 ± 0,040 [*]	0,103 ± 0,001

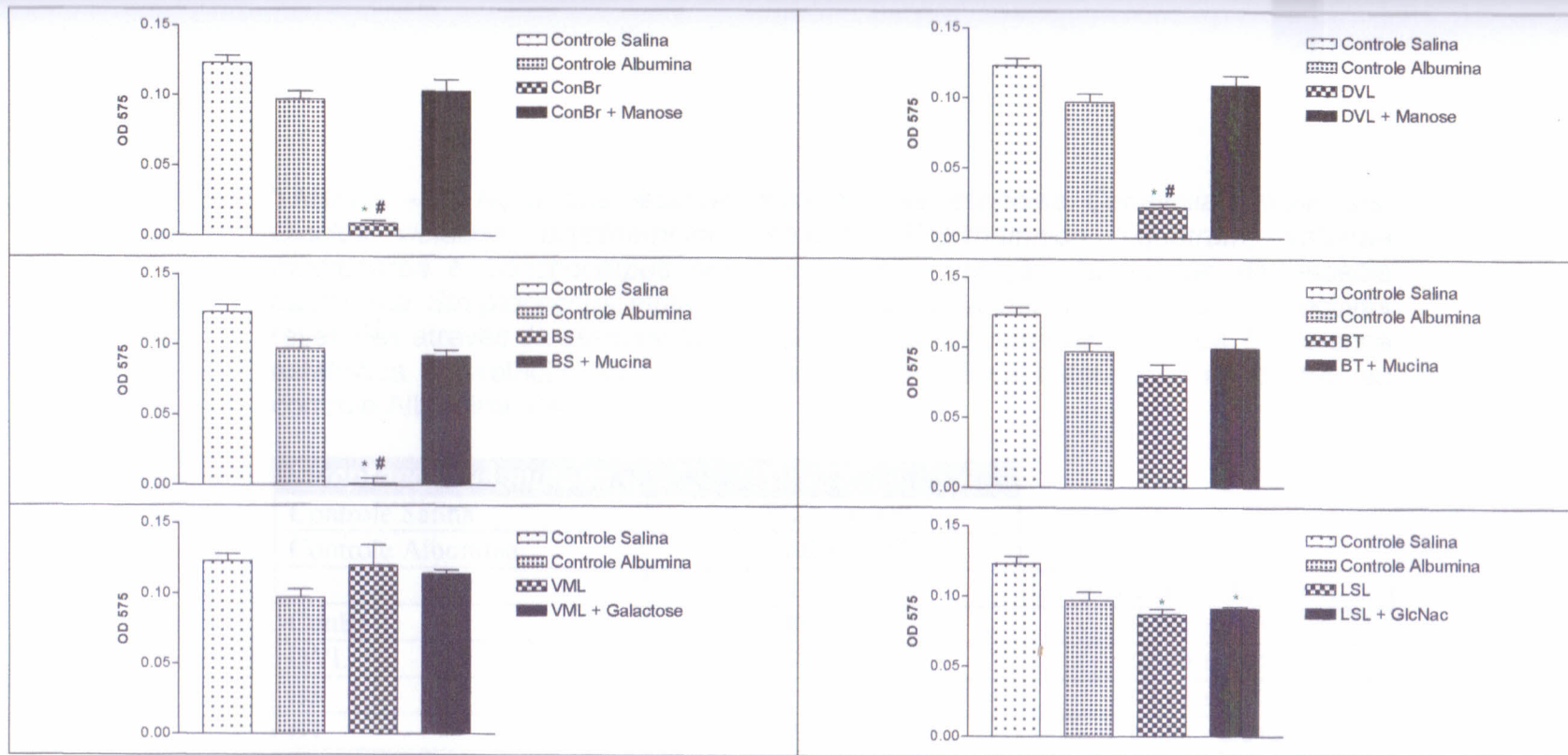


FIGURA - 26. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus mutans* a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. P<0,01. (n = 6)

TABELA - 8. Ação das lectinas isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Vatairea macrocarpa* e *Lonchocarpus sericeus* sobre a inibição da adesão da espécie bacteriana *Streptococcus mutans* (n = 6) a película adquirida e suas respectivas reversões através da associação das lectinas com açúcares específicos. * Diferença estatística em relação ao controle Salina. # Diferença estatística em relação ao controle Albumina. P<0,01.

<i>Streptococcus mutans</i>		ABS 575 nm	
Controle Salina	0,123 ± 0,009		
Controle Albumina	0,097 ± 0,010		
	Lectina	Lectina + Açúcar	
ConBr	0,009 ± 0,003 ^{*#}	0,103 ± 0,014	
DVL	0,022 ± 0,004 ^{*#}	0,109 ± 0,012	
BS	0,001 ± 0,007 ^{*#}	0,092 ± 0,007	
BT	0,080 ± 0,013	0,099 ± 0,013	
VML	0,120 ± 0,041	0,114 ± 0,005	
LSL	0,087 ± 0,006 [*]	0,091 ± 0,002 [*]	

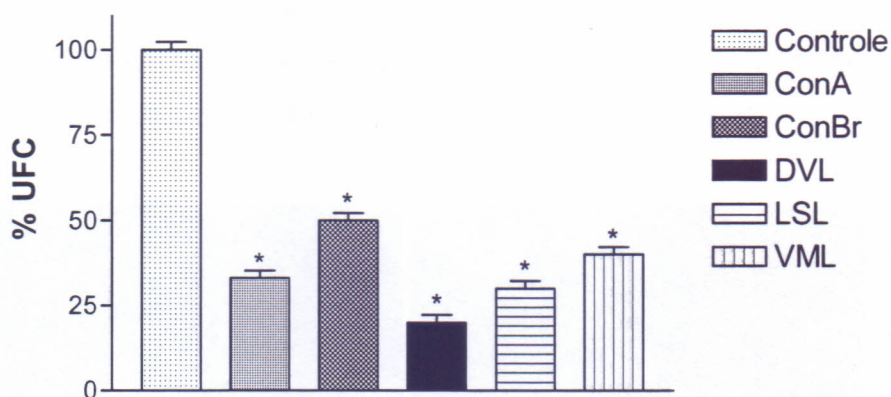


FIGURA 27. Atividade antibacteriana de lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violaea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa* contra *S.murans* * Diferença estatística em relação ao controle Salina. $p < 0,01$.

4.6. Resultado da análise histopatológica

A figura 28 e 29 apresentam um controle de *S. mutans* somente incubada com solução salina.

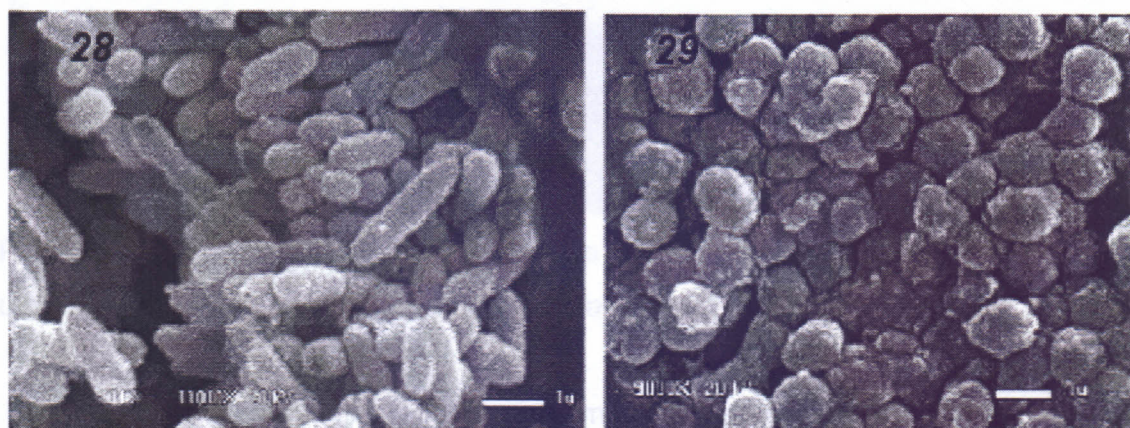


FIGURA-28 e 29. Controles negativos da atividade de lectinas nas culturas de *S. mutans* incubadas somente com salina durante uma hora.

Nas figuras 30 e 31 e nas figuras 32 e 33 observamos as fotomicrografias dos ensaios com lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* e

Canavalia brasiliensis e verificamos que mesmo com um efeito na redução da viabilidade de colônias observados no experimento de atividade antibacteriana não se verifica modificação estrutural visível ao MEV nas bactérias.

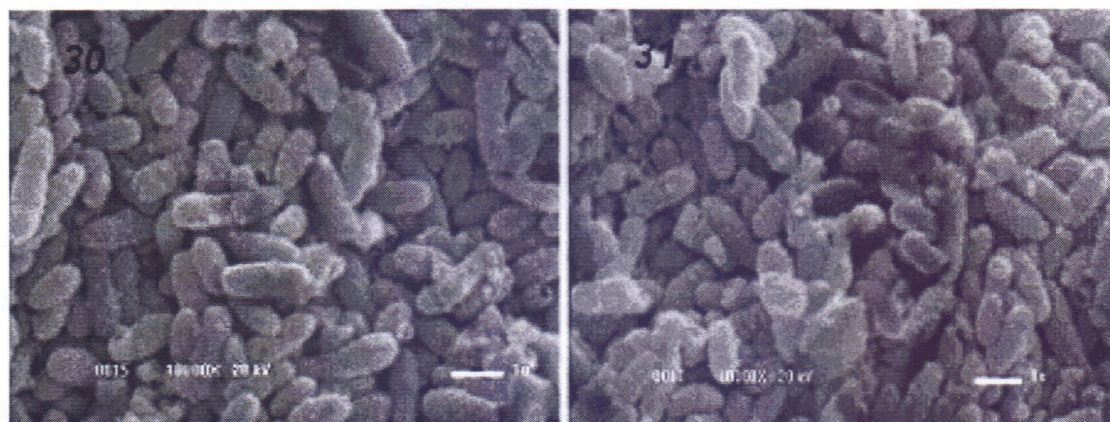


FIGURA-30 e 31. Microscopia eletrônica de varredura de *S. mutans* incubadas por uma hora com a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA)

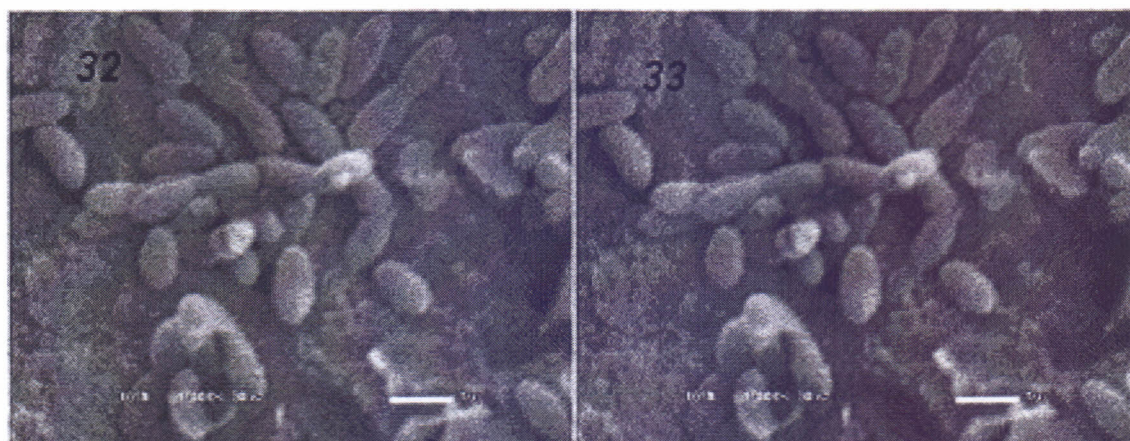


FIGURA 32 e 33 Microscopia eletrônica de varredura de *S. mutans* incubadas por uma hora com a lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr).

Na figura 34 reproduzimos um controle negativo para compararmos com a figura 35 onde observamos o efeito observável ao MEV da lectina DVL nas bactérias promovendo certo enrugamento da membrana.

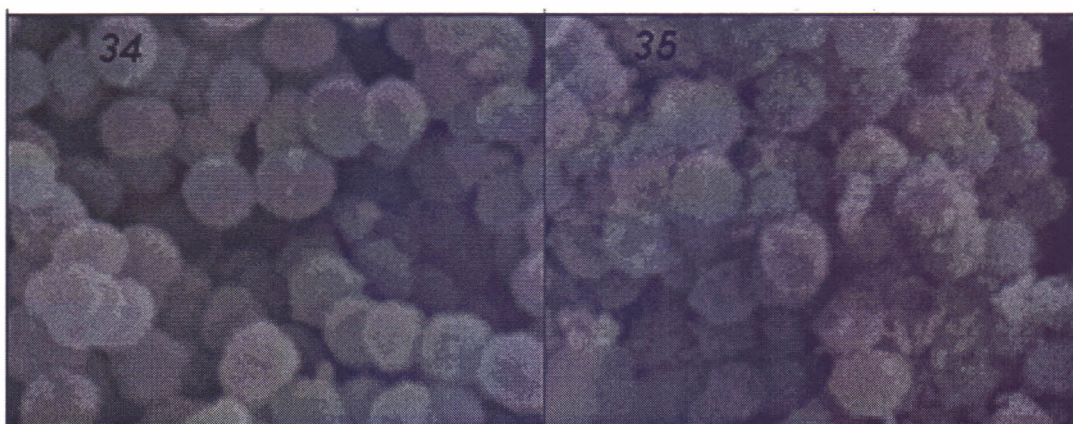


FIGURA 34 e 35. Microscopia eletrônica de varredura do controle negativo (34) e do efeito da lectina DVL sobre *S. mutans* (35).

Ao observarmos a microscopia eletrônica de transmissão dos ensaios envolvendo DVL, quando comparados ao controle negativo, verificamos sensíveis modificações de membrana possivelmente relacionadas ao enrugamento encontrado na MEV na Figura 36 (Controle) e na Figura 37 (DVL).

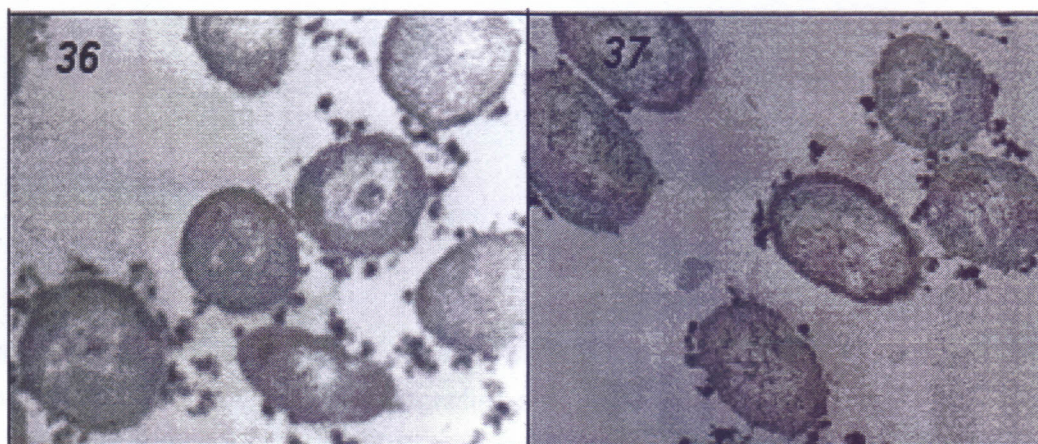


FIGURA 36 e 37. Fotomicrografias eletrônicas de transmissão do controle negativo (Salina) e do efeito da DVL sobre *S. mutans*.

Na figura 38 e 39 verificamos o comparativo entre o controle negativo e a amostra incubada com a lectina LSL. Observamos muito claramente uma desestruturação da membrana das células o que pode responder pelo efeito encontrado na atividade antibacteriana.

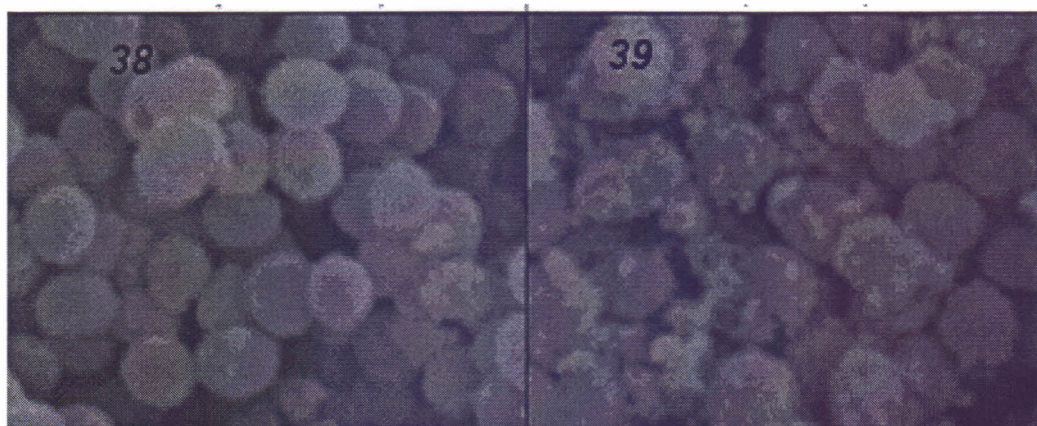


FIGURA 38 e 39. Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando o controle negativo (Salina) (38) e a amostra tratada com LSL (39).

Na figura 41 verificamos a perda de material citoplasmático bacteriano após rompimento de membrana provocada pela lectina LSL.

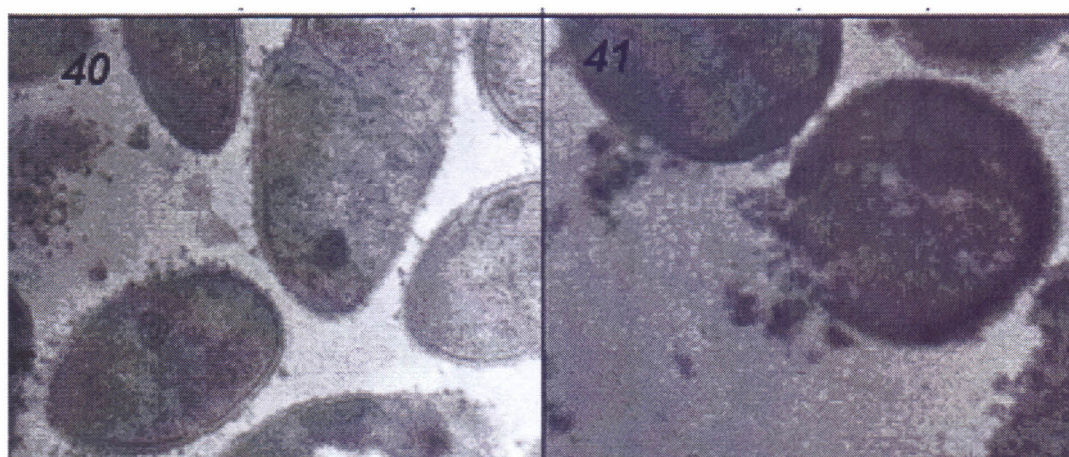


FIGURA 40 e 41. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando o controle negativo (Salina) (40) e a amostra tratada com LSL (41).

Os dados obtidos com a lectina VML são semelhantes aos encontrados com a lectina LSL como podemos observar nas figuras 43 e 45 mas não verificamos ruptura de membrana e sim coagulação citoplasmática e alteração de membrana.

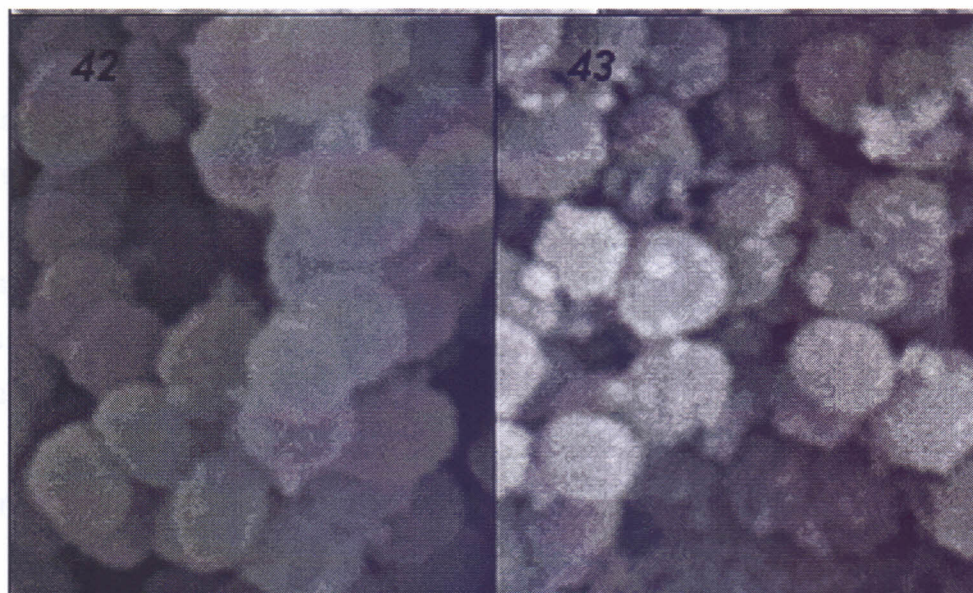


FIGURA 42 e 43. Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando o controle negativo (Salina) (42) e a amostra tratada com VML (43).

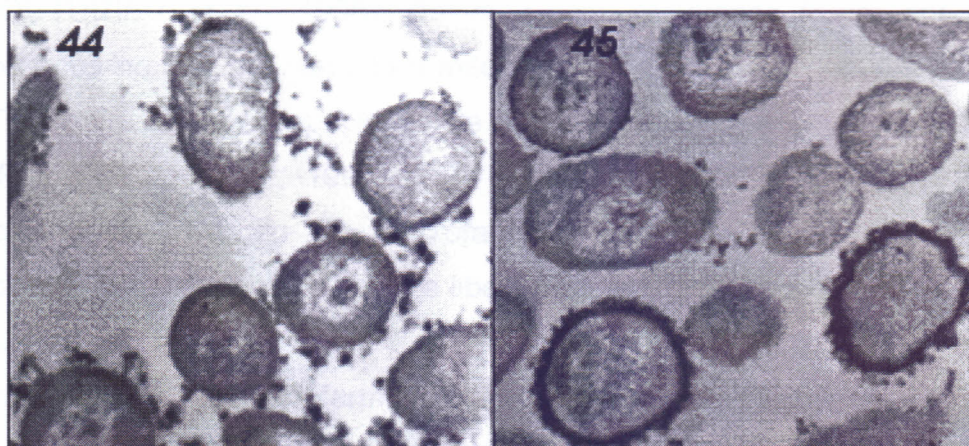


FIGURA 44 e 45. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando o controle negativo (Salina) (44) e a amostra tratada com VML (45).

5.DISSCUSSÃO

Embora permaneça ainda uma incógnita a real função das lectinas dentro dos organismos onde são encontradas, tem sido verificado um crescente interesse no estudo destas moléculas, sobretudo pela gama de aplicações possíveis para as mesmas. Em áreas aplicadas, como medicina e agricultura, várias lectinas têm sido patenteadas nas últimas décadas em utilizações das mais variadas, que vão da utilização em cancerologia para algumas à capacidade inseticida para outras, o que pode ser facilmente detectado com uma simples busca em bancos de patentes (<http://www.cni.org.br/links/links-at-patentes.htm>).

Em imunologia, para citar um exemplo, o foco sobre estas proteínas aumentou significativamente após a descoberta de que a jacalina, a lectina de sementes de *Artocarpus integrifolia*, era capaz de discriminar IgA1 de IgA2 (AUCOUTURIER *et al.*, 1996). Assim, novos resultados foram obtidos nos últimos anos no que diz respeito a mitogenicidade destas moléculas (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), a capacidade de indução da síntese de interferon *in vitro* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992) e *in vivo* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996), a capacidade de ativação de macrófagos (RODRIGUEZ *et al.*, 1992) e a capacidade de indução da síntese e liberação de óxido nítrico (ANDRADE *et al.*, 1999).

Do ponto de vista farmacológico, é crescente o interesse por lectinas como ferramentas para o estudo de processos inflamatórios (ASSREUY *et al.*, 1997). Tem sido demonstrado que algumas lectinas apresentam efeito edematogênico (BENTO *et al.*, 1993) e outras a capacidade de induzir a liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994). Este interesse ficou mais acentuado após a descoberta de que uma mesma lectina, dependendo da via de administração (i.p. ou i.v.), pode apresentar um efeito pró-inflamatório ou anti-inflamatório (ASSREUY *et al.*, 1997). Além disto, lectinas com capacidade anti-inflamatória foram capazes de reverter processos inflamatórios severos como a

cistite hemorrágica, um efeito colateral desastroso em tratamentos de certos tipos de câncer com ciclofosfamida (ASSREUY *et al.*, 1999).

Apesar de todas essas frentes de pesquisa e mesmo diante de possibilidades muito visíveis de aplicações, poucas publicações têm evidenciado a aplicação direta de lectinas como insumos profiláticos em patologias orais dependentes da formação de biofilmes, como a cárie e a doença periodontal. Em minuciosa busca bibliográfica encontramos provavelmente a primeira tentativa de associar a lectinologia à odontologia em 1983 com uma publicação de GIBBONS e DANKERS (1983). Antes desse trabalho, o que se verificava era a tentativa de inibir a agregação bacteriana provocada por componentes salivares com o intuito de se estudar a natureza dos receptores envolvidos, e isto ficou muito bem exemplificado com os trabalhos que utilizaram a WGA (MIRTH *et al.*, 1979) e a ConA (MIRTH *et al.*, 1981) com intuito claro de se buscar nas lectinas uma ferramenta de estudo. Gibbons e Dankers (1983) foram mais além, pois verificaram a associação de lectinas a tecidos orais depois de uma alimentação com trigo ou amendoim. Utilizando-se testes da época eles detectaram WGA e PNA nos epitélios da mucosa oral. Dentro desse contexto, mais de dez anos depois, em 1994, Siminonato *et al.* verificaram que a lectina de batata (*Solanum tuberosum*) interfere no processo de colonização de *Streptococcus salivarius* às superfícies epiteliais. Na atualidade, o que se tem visto é um crescente número de trabalhos tentando associar princípios ativos de plantas na tentativa de interferir na colonização, utilizando-se extratos brutos, a favor da saúde bucal tentando evitar assim, tanto a cárie quanto a doença periodontal (WOLINSKY e SOTE, 1984; WU-YUAN *et al.*, 1990; HARPER *et al.*, 1990; ISRAELSON, 1991; IKENO *et al.*, 1991; OTAKE *et al.*, 1991; MORAN *et al.*, 1991; OOSHIMA *et al.*, 1993).

O uso de lectinas como ferramentas biológicas já é mundialmente aceito e essas proteínas já são usadas para caracterizar a natureza glicídica de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* através de marcação com FITC (STRATHMANN *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos nos ensaios de marcação de película adquirida (PAE) ,com lectinas associadas com FITC, demonstraram a grande potencialidade dessas moléculas em caracterizar a natureza glicídica da película adquirida do esmalte (PAE). Notamos nas figuras 9 a 20 o padrão próprio de marcação para cada lectina utilizada, e este padrão está relacionado com suas especificidades. As lectinas glicose/manose específicas marcam a PAE de maneira irregular, como em pontos específicos, enquanto que lectinas de algas marinhas marcam mais uniformemente, provavelmente por sua especificidade a carboidratos complexos e/ou por seu baixo peso molecular quando comparadas a lectinas de plantas, o que diminuiria prováveis impedimentos estéricos de ligações contínuas das lectinas de plantas superiores que são maiores.

É importante notar que resíduos de galactose e de N-acetil glicosamina também foram detectados respectivamente pelas lectinas VML e LSL demonstrando a variabilidade de glicanos presentes. Além disto, devemos salientar que o interesse era verificar e mostrar as possibilidades das lectinas em marcar sítios específicos e para isso foram utilizados "pool" de saliva de vários (cinco) pacientes o que certamente aumentou muito a variabilidade de carboidratos na PAE. Um novo e importante campo de pesquisa se abre ao vislumbrarmos a possibilidade de verificação de variações interpersonais detectadas por lectinas para pacientes com alto e baixo risco de cárie.

Em 1994 alguns autores apresentaram dados de inibição da lectina presente na superfície de *S. sobrinus* e *S. cricetus* através de fluoreto de sódio, demonstrando a importância dessa proteína na colonização dentária e na progressão das patologias orais. Os autores concluíram que um dos mecanismos profiláticos do flúor era exatamente inibição de lectinas bacterianas (DOYLE *et al.*, 1994). Em 2000 foi relatada a ação de policarboxilatos na inibição da mesma lectina (DOYLE *et al.*, 2000).

Ao observarmos os resultados apresentados nas Figuras 22 a 26, assim como nas tabelas 4 a 8, verificamos que em todas as cepas estudadas as lectinas ConBr e DVL foram significativamente efetivas na inibição da adesão bacteriana a PAE tanto em relação ao controle com solução salina quanto em

relação ao controle com solução de albumina, utilizado nesses experimentos com o intuito de provar que o efeito provocado pelo impedimento estérico das ligações é mínimo. Mesmo sendo lectinas denominadas "Con A like", e específicas pelos mesmos açúcares, elas apresentam certas diferenças nas potencialidades de inibição, o que é mais proeminente quando verificamos o efeito dessas lectinas sobre a adesão de *S. mitis*. Lectinas possuem um papel importante na agregação dentro do biofilme bacteriano formado nas superfícies dentais. Doyle e Denson em 1994 apresentam dados de estabilização de uma lectina glicose-manose específica em cepa de *Streptococcus sobrinus*, inclusive apresentando dados de inibição desta lectina em tratamento com SDS. O trabalho de Doyle e Denson (1994) nos leva a imaginar, com relação a *S. sobrinus*, e a supor para as outras espécies bacterianas estudadas, que o efeito encontrado pode ter sido devido à competição direta das lectinas vegetais utilizadas com a lectina bacteriana em relação a sítios específicos na película adquirida. Os resultados de inibição das lectinas estudadas, e aqui especificamente as glicose/manose específicas nos confirmam fortemente essa teoria visto que quando as lectinas têm o seu sítio previamente ocupado, no caso por manose, as bactérias voltam a se ligar semelhantemente aos controles. Em outras palavras, os dados de reversão de inibição da adesão bacteriana a PAE nos ratificam que o efeito é lectínico, ou seja, está relacionado com o sítio de ligação a carboidratos das lectinas.

Ao analisarmos, nas mesmas figuras e tabelas, os efeitos encontrados das lectinas de algas (BSL e BTL), verificamos a efetividade das mesmas contra quase todas as bactérias estudadas, excetuando-se a ausência de efeito da BTL quanto ao estudo da adesão de *S. oralis* e *S. mutans* a PAE. É importante salientar que sempre se observa uma maior potência da lectina BS sobre a BTL nesse modelo de estudo evidenciando-se diferenças quantitativas entre essas duas lectinas. É importante ressaltar o grande efeito da BSL sobre a inibição da adesão de *S. mutans* à película conforme podemos verificar na figura 26 e na tabela 8.

Ao observarmos os resultados da figura 21 ratificamos os dados de termoestabilidade da BSL encontrados em AINOUZ *et al.*, 1995. Em nosso modelo a BSL mostrou ser termoestável visto que mostra atividade mesmo depois de uma solução da lectina ter permanecido por 20 minutos a 100 graus celsius. A capacidade de ligação a PAE após esse tempo vai diminuindo até que se extingue após uma hora de tratamento térmico. Ao imaginarmos futuramente utilizar lectinas na cavidade oral, como produto profilático, a termoestabilidade passa a ser um fator muito importante visto que na boca ocorrem freqüentes mudanças de temperatura e principalmente, pH.

Um fato extremamente interessante ocorreu quando verificamos o efeito da lectina VML. Esta lectina galactose-específica foi eficaz e específica somente para cepas consideradas colonizadoras iniciais, exceto *S.oralis*, e não teve nenhum efeito de inibição de adesão sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*, que são cepas colonizadoras a posteriori. Esse resultado é uma forte evidência que o carboidrato galactose é mais importante na adesão de colonizadores iniciais a PAE do que sobre a adesão de cepas cariogênicas propriamente ditas a PAE. Isso é ratificado quando verificamos os resultados da reversão dos efeitos encontrados quando da associação prévia de galactose a VML. É bom lembrar que ao estudarmos isoladamente cada uma das bactérias perdemos considerável fidelidade com relação aos biofilmes visto que sabemos hoje em dia, e já é ponto pacífico entre os pesquisadores, que as bactérias em biofilmes possuem metabolismo completamente diverso daquelas planctônicas.

A lectina LSL, ao contrário dos dados encontrados com a VML, foi a menos efetiva com relação aos colonizadores iniciais sendo efetiva somente quando do estudo com *S.mitis*. Ao observamos o gráfico em questão (Figura 24), verificamos que foi conseguida não somente a reversão com N-acetilglicosamina mas também a associação prévia com o carboidrato específico aumentou a adesão das bactérias, fato ainda não explicado. Seriam necessarias maiores análises com relação a esse efeito utilizando-se provavelmente outros modelos de estudo. Com relação a *S. mutans* e *S. sobrinus*, a lectina LSL teve um efeito que somente foi revertido no caso de *S. sobrinus*, mas não revertido

no caso de *S.mutans*, o que provavelmente se deve a uma maior afinidade da LSL por glicanos da PAE do que pelo açúcar. Além disto, tem sido demonstrado para outras lectinas que se ligam a quitina que o monossacarídeo, no caso o N-acetil-glicosamina, é um fraco inibidor destas lectinas quando comparado com dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc. do mesmo açúcar (ALLEN, 1979; ANATHARAM *et al*, 1986).

Ao compararmos os dados de ligação de lectinas associadas a FITC a película adquirida com os resultados encontrados na inibição da adesão bacteriana *in vitro* observamos alto grau de coerência entre os mesmos, ou seja, as lectinas que se ligam eficientemente a PAE são também eficazes em inibir a adesão de cepas bacterianas a PAE. Essa coerência diminui, entretanto, quando comparamos os dados de reversão dos efeitos em cada um dos modelos. Enquanto os dados das lectinas ConBr, DVL e VML, quanto a capacidade de reversão pelo açúcar específico permanecem coerentes nos dois modelos, os dados de LSL, BTL e BSL mostram-se diferentes. Para essas últimas lectinas os açúcares específicos, ou a mucina no caso das lectinas de algas, não são capazes de reverter a ligação a PAE como bem podemos observar Tabela 3. Entretanto, ao analisarmos os dados de reversão da atividade dessas lectinas no modelo de inibição da adesão bacteriana verificamos que na maioria das vezes esses mesmos açúcares são capazes de reverter esse efeito. Pelo fato de que nos dois modelos as superfícies são diferentes, podemos especular que estas diferenças se devam a diferenças no tipo de glicoproteína salivar que esta sendo imobilizada em cada um deles. Além disto, mesmo que as glicoproteínas imobilizadas tenham sido as mesmas em ambos os modelos, não podemos descartar a possibilidade de, em função de serem superfícies diferentes, a disposição estereoquímica destas glicoproteínas nas duas superfícies sejam diferentes, o que determinaria potências de interação de uma mesma lectina com a mesma glicoproteína imobilizada em superfícies diferentes.

Sabendo que algumas lectinas de plantas e fungos são capazes de se ligar diretamente ao peptidoglicano da parede celular de bactérias (ROUGÉ *et al.*, 1997) e que esta ligação poderia estar relacionada com algum efeito

antibiótico, foram realizados testes de atividade antimicrobiana, sendo observado que as lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *C. brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa* mostraram-se eficazes em diminuir a viabilidade de colônia de *S. mutans*. A lectina mais potente neste caso, a DVL, é uma lectina glicose/manose específica, assim como a ConBr e a ConA, mas apesar do alto grau de similaridade (mesmos resíduos ocupando as mesmas posições nas sequências primárias) entre estas lectinas, apresentaram potências de efeitos significativamente diferentes. As lectinas LSL e VML também mostraram capazes de inviabilizar colônias de *S. mutans*, apesar de ter sido um efeito menos potente que aquele da DVL.

Ao analisarmos os efeitos sobre *S. mutans* das lectinas através de MEV (microscopia eletrônica de varredura) e MET (microscopia eletrônica de transmissão) verificamos que para algumas lectinas o efeito está diretamente relacionado a uma modificação da parede celular e provavelmente da membrana plasmática dessas bactérias, com o foi o caso das lectinas DVL, LSL e VML, chegando mesmo a efeitos drásticos de lise de membranas (mais observado no caso da LSL). Já para as outras lectinas, ConBr e ConA, não foram observadas alterações morfológicas nas membranas bacterianas, apesar das mesmas terem apresentado efeitos de inibição de viabilidade de colônias. Estas duas situações pressupõem mecanismos diferente de atuação para este dois grupos de lectinas, e podemos hipotetizar que, enquanto o primeiro grupo tem um efeito direto nas membranas das bactérias, o segundo grupo provavelmente exerce este efeito via sinalização em receptores de membranas ou (o que este tipo de experimento não permite analisar) via receptores endógenos após endocitose destas lectinas.

Ao analisarmos o conjunto de resultados obtidos com as lectinas utilizadas, podemos claramente concluir que existe um real potencial anticárie dessas moléculas sendo possível a utilização destas como ferramentas de estudo, como na caracterização carboidrática de película, assim como na profilaxia visto que existem dois mecanismos de ação potencialmente eficazes: (i) inibição da adesão bacteriana a PAE e; (ii) o efeito antibacteriano. É válido

ressaltar que os efeitos verificados foram analisados isoladamente para cada uma das lectinas utilizadas, podendo ser possível a utilização de várias lectinas ativas para cada tipo de cepa importante que queremos evitar, obtendo-se sigergismos de efeitos. Nesse trabalho verificamos que a lectina VML é mais efetiva na inibição da adesão a PAE de colonizadores iniciais enquanto a lectina LSL é muito mais eficaz contra as cepas produtoras de ácido. A união dessas potencialidades talvez seja muito interessante ao pensarmos na inserção de algum produto a base de lectinas.

Novos estudos com aprofundamento em cada uma das lectinas, assim como a utilização de modelos de biofilmes mais fidedignos, experimentação "in vivo", seguindo testes de citotoxicidade de lectinas confluindo para protocolos em humanos são a linha natural que se buscará a partir de então, na tentativa de inserir uma ou mais lectinas em bohechos ou em algum outro produto importante na prevenção da cárie e da doença periodontal. Em pacientes especiais, onde a escovação perde a eficiência desejada, a utilização de um produto que desestruture o biofilme inicial seria de grande valia.

Finalmente, e não menos importante, não devemos perder a perspectiva de que, lectinas que tenham efeitos em diferentes estágios de colonização da película adquirida, também podem ser utilizadas concomitantemente como "drug delivery" de drogas com ações adicionais sobre os mesmos microorganismos.

6. CONCLUSÃO

As lectinas isoladas de sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Lonchocarpus sericeus* e *Vatairea macrocarpa*, e as lectinas isoladas das algas *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum* são ferramentas úteis de caracterização de carboidratos presentes na película adquirida do esmalte e possuem grande potencialidade anticariogênica, visto que a maioria destas lectinas são capazes de inibir "in vitro" a adesão a PAE de cinco bactérias importantes no processo de formação de biofilme patogênico além de algumas possuírem também, certo efeito antibacteriano contra *S. mutans*. Para as lectinas DVL, LSL e VML o efeito antibacteriano parece estar associado a uma desestruturação morfológica observada na microscopia eletrônica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I. L. and SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian Marine Algae for Hemagglutinins. **Botanica Marina**, v.34, p.211-214, 1991.

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; BENEVIDES, N. M. B.; FREITAS, A. L. P.; COSTA, F. H. F.; CARVALHO, PINHEIRO - JOVENTINO, M. R. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extracts. **Botanica Marina**, v. 35, p. 475-479, 1992.

AINOUZ I. L.; SAMPAIO A. H.; FREITAS A. L. P., BENEVIDES, N. M. B. E. MAPURANGA S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 7, n. 1, p. 15-19, 1995.

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. **Biochim Biophys Acta**, v. 23, 147, n. 2, p. 262-71, 1967.

AL IAFI, T.; ABABBEH, H. The effect of the extract of the Miswak (chewing sticks) used in Jordan and the Middle East on oral bacteria. **Int.Dent.J.**, v. 45, p. 218-222, 1995.

ALENCAR, N. M.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A and RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediations of inflammation**, v. 8, p. 107-131, 1999.

ALLEN, A. K. A lectin from the exudate of the fruit of the vegetable marrow (*Cucurbita pepo*) that has a specificity for beta-1,4-linked N-acetylglucosamine oligosaccharides. **Biochem. J.**, v. 183, n. 1, p. 133-137, 1979.

ANANTHARAM, V.; PATANJALI, S. R.; SWAMY, M. J.; SANADI, A. R.; GOLDSTEIN, I. J.; SUROLIA, A. Isolation, macromolecular properties, and combining site of a chito-oligosaccharide-specific lectin from the exudate of ridge gourd (*Luffa acutangula*). **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 31, p. 14621-14627, 1986.

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S. and BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced NO production. **Celular Immunology**, v. 194, p. 98-112, 1999.

ASSMAN, F. (1911). Beitrage zur Kenntnis pflanzenlicher Agglutinine. **Arch. Ger. Physiol.** citado por Gold & Balding, v. 137, p. 489, 1975.

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**. Inglaterra. v. 6, p. 201 - 210, 1997.

ASSREUY, A. M.; MARTINS, G. J.; MOREIRA, M. E. F.; BRITO, G. A. C.; CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Prevention Of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis By Glucose-Mannose Binding Plant Lectins. **The Journal of Urology**. v. 161, p. 1988 - 1993, 1999.

AUCOUTURIER P, PREUD'HOMME J. L.; FRIDMAN W. H.; MATHIOT C. Recombinant interleukin-2 infusions and serum IgG subclass levels. **Blood**. v. 15, n. 87(2), p. 841-3, 1996.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae* subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Brasil. v. 96, n. 5, p. 673 - 678, 2001

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. and CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXERA, M.; CONRADO DOS SANTOS, W. L.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; FALCOFF, E. and BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 60, p. 237-250, 1996.

BENTO, C. A. M.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A. and BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and Actions**, v. 38, p. 48-54, 1993.

BEUTH, J.; STOFFEL, B.; KO, H. L.; JELJASZEWICZ, J.; PULVERER, G. Immunomodulating ability of galactoside-specific lectin standardized and depleted mistletoe extract. **Arzneimittelforschung**. V. 45, n. 11, p. 1240-1242, 1995.

BEZERRA, A. C. B.; TOLEDO, O. A. Nutrição, dieta e cárie. In: **ABOPREV: promoção de saúde bucal** coordenação Léo Kriger. 2. ed. São Paulo: **Artes Médicas**, p. 43-67, 1999.

BEZOUSKA, K.; TABOURSKY, O.; DUBRYCHT, J.; POSPUSIL, M. and KOCOUREK, J. Identification of porcine lymphocyte membrane lectins as possible NK cell receptors using new derivatives of N-linked glycoproteins. In: KOCOUREK,

J. & FREED, D.L.J. Eds: Lectins, Biology, Biochemistry, **Clinical Biochemistry**, v. 7, p. 207-215, 1990.

BIES, C.; LEHR, C. M.; and WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 425-435, 2004.

BLACK, C. Biofilm-specific surface properties and protein expression in oral *Streptococcus sanguis*. **Arch Oral Biol J** v. 49, p. 295-304, 2004.

BOWDEN, G. H. W. Effects of fluoride on the microbial ecology of dental plaque. **J. Dent. Res.** v. 69, p. 653-59, 1990.

BOYD, W. C; REGUERA, R. M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **J. Immunol.** v. 62, p. 333-339, 1949.

BOYD, W. C. and SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. In: *Plant Lectins. Molecular and biological aspects*. **Ann. Rev. Plant Physiol.** v. 36, p. 209-234, 1954.

BUCK, C. A. Adhesion mechanisms controlling and cell-matrix interactions during metastatic process. In: MENDELSON, J., HOWLEY, P. M., ISRAEL, M. A. LIOTTA, L. A. **The Molecular basis of cancer**, p. 172, 1995.

BUISCHI, Y. P. *Promoção de saúde oral na clínica odontológica*. São Paulo: Artes Médicas: EAP-APCD, 2000. 359p. NEWBRUN, E. **Cariologia**. São Paulo: Santos. p. 326, 1988

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. and GRANGEIRO, T. B. Primary structure and functions of plant lectins. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** v. 5, n. 2, p. 193-202, 1993.

CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; CORDEIRO, E. F.; OLIVEIRA, J. T. A. and MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Rev. Bras. De Fisiol. Veg.** v. 8, n.1, p. 31-36, 1996.

CAVADA, Benildo Sousa; SANTOS, C F; GRANGEIRO, T B; NUNES, E. P.; SALES, P V P; RAMOS, R L; SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C V; CALVETE, J J. Purification And Characterization Of A Lectin From Seeds Of *Vaitarea Macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B. and BARRALNETO, M. Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Subtribe Lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, p. 123-135, 2001

CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; IGLESIAS, M. M; TRONCOSO, M. F; TURYN, D; DOMINICI, F P. Glucose-mannose binding Lectins Isolated from Brazilian Beans stimulate the Autophosphorylation of the Insulin Receptor vitro. **Hormone and Metabolic Research**, Inglaterra, v. 35, n. 2, p. 125-127, 2003.

CIANCIO, S. G. Agents for the management of plaque and gingivitis. **J. Dent. Res.**, v. 71, p. 1450-4, 1992.

COLOMBO, A. V.; HIRATA-JÚNIOR, R.; SOUZA, C. M. R.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; PREVIATO, J. O.; FORMIGA, L. C. D.; ANDRADE, A. F. B. and MATTOS-GUARALDI, A. L. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, p. 235-239, 2001.

CURTIS, G. D.; SLACK, M. P. Wheat-germ agglutination of *Neisseria gonorrhoeae*. A laboratory investigation. **Br J Vener Dis.** v. 57, n. 4, p. 253-5, 1981.

DATTA, P. K.; FIGUEROA, M. O. D. C. R. and LAJOLO, F. M.. Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (pinhão). **Plant Physiol.**, v. 97, p. 856-862, 1991.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev.** v. 2, p. 114-122, 2003.

DE STOPPELAAR J. D.; KONIG, K. G.; PLASSCHAERT, A. J.; VAN DER HOEVEN, J. S. Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol.** v. 16, n. 8, p. 971-5, 1971.

DOSET, M.; HENLEY, R. R. (1917) **Jornal of the American Veterinary Medical Association**, Citado por Kocourek, v. 50, p. 669, , 1986.

DOYLE, R. J., DENSON, A. M. Stabilization of the glucan-binding lectin of the *Streptococcus sobrinus* by specific ligand. **Archives of Oral Biology.** v. 43, p. 33-38, 1994.

DOYLE, R. J.; TAYLOR, K. G.; TAWEECHAI SUPAPONG, S.; GOH, C. T. polycarboxylates inhibit the glucan-binding lectin of streptococcus sobrinus. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1523, p. 111-116, 2000.

EVANS, W. R.; STAMM, J. W.; An epidemiological estimate of the critical period during which human maxillary central incisors are most susceptible to fluorosis. **J Publ HLTH Dent**, v. 49, p. 259-271, 1989.

FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. and GOMES, J. C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from brazilian beans and concanavalina A. **Inflam. Res.** v. 45, n. 9, p. 442-447, 1996.

FREITAS, S. F. T. História social da cárie dentária. Bauru: EDUSC, p. 124, 2001.

FOSTER, J. S.; PAN P. C. and KOLENBRANDER, P. E. Effects of antimicrobial agents on oral biofilms in a saliva-conditioned flowcell. **Biofilms**, v. 1, p. 5-12, 2004.

GARTNER, T. K. and OGILVIE, M. L. Isolation and characterization of three Ca²⁺ dependent beta-galactoside-specific lectins from snake venoms. **Biochem. J.** v. 224, p. 301-307, 1984.

GIBBONS, R. J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annu.Re.Microbiol**, v. 29, p. 19-44, 1975.

GIBBONS, R. J. and J. VAN HOUTE. Bacterial adherence and the formation of dental plaques, *In* E.H. Beachey (ed.), Bacterial adherence. **Receptors and recognition**, serie B Chapman and hall, London, v. 6, p. 61-104, 1980.

GIBBONS, R. J.; DANKERS, I. Association of food lectins with human oral epithelial cells in vivo. **Arch. Oral Biol.** v. 28, p. 561-566, 1983.

GIBBONS, R. J.; COHEN, L.; HAY, D. I. Strains of *S. mutans* and *S. sobrinus* attach to different pellicle receptors. **Infect Immunity** v. 52, n. 2, p. 555-561, 1986.

GIBBONS, R. J., Adherence interactions that may affect microbial ecology in the mouth. **J. Dent. Res.**, v. 63, p. 378-385, 1984.

GIBBONS, R. J.; Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: A contribution of oral microbiology. **J. Dent. Res.**, v. 75, p. 866-870, 1996.

GLICK, G. D.; TOOGOOD, P. L.; WILEY, D. C.; SKEHEL, J. J. and KNOWLES, J. R. Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalents sialosides. **The J. Biochem. Chem.**, v. 266, n. 35, p. 23660-23669, 1991.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T. and SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 60, 1980.

GOMES, J. C.; FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S. and MOREIRA, R. A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GRUBHOFFER, L. and MATHA, V. Characteristics of a new L-fucose and N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from the integument of *Galleria mellonella* larval. **Comp. Biochem, Physiol., B:** v. 100 b, n. 1, p. 73-76, 1991.

HAMADA, S.; and SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.** v. 44, p. 331-384, 1980.

HAMMARSTROM, S. Snail (*Helix pomatia*) agglutinin. **Meth. Enzymol.**, v. 28, p. 368-383, 1972.

HARPER, D. S.; MUELLER, L. J.; FINE J. B.; GORDON, J.; LASTER, L. L.; Effect of 6 months use of a dentifrice and oral rinse containing sanguinaria extract and zinc chloride upon the microflora of the dental plaque and oral soft tissues. **J Periodontol**, v. 61, n. 6, p. 359-63, 1990.

HAY, D. I.; Salivary factors in caries models. **Adv Dent Res**. v. 9, n. 3, p. 239-43, 1995.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; FUSETANI, N.; HASHIMOTO, K. and ITO, K. Hypnins low-molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 873, p. 228-236, 1986.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C.; Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res**, v. 25, n. 5, p. 347-51, 1991.

ISRAELSON, L.; The role of natural products in the oral health care. **J. Clin. Dent.** (Spec. Iss) p. 5-6, 1991.

JACOBSON, R. L. and DOYLE R. J., **Parasitol Today**, 12(2): 55-61, 1996.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Streptococcal adhesion and colonization. **Crit Rev Oral Biol Med**. v. 8, n. 2, p. 175-200, 1997.

KAWAGISHI, H.; ABE, Y.; NAGATA, T.; KIMURA, A. and CHIBA, S. A lectin from mushroom *Pholiota aurivella*. **Agric. Biol. Chem.** v. 55, n. 10, p. 2485-2489, 1991.

KASUGA, Y.; IKENOYA, H.; OKUDA, K.; Bactericidal effects of mouthrinses on oral bacteria. **Bull Tokyo Dent. Coll**, v. 38, p. 297-302, 1997.

KELLENS, J. T. C.; PEUMANS, W. J. Biochemical and serological Comparison of lectins from different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. **Mycol. Res.** v. 95, n. 10, p. 1235-1241, 1991.

KEYES, P. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Archs Oral Bio J.** v. 7, p. 304-320, 1960.

KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1033, p. 210-213, 1990.

KOLENBRANDER, P. E.; ANDERSEN, R. N. Characterization of *Streptococcus gordonii* (S. *sanguis*) PK488 adhesin-mediated coaggregation with *Actinomyces naeslundii* PK606. *Infect Immun.* v. 58, n. 9, p. 3064-72, 1990.

LAMKIM, M. S. New in vitro model for the acquired enamel pellicle: Pellicles formed from whole saliva show inter-subject consistency in protein composition and proteolytic fragmentation patterns. *J Dent Res* v. 80, p. 385-388, 2001.

LANDSTEINER, K. and RAUBITSCHKEK, H. (1907). Beobachtungen über Hamolyse and Hemagglutination. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. citado por Gold & Balding*, v. 45, n. 660, 1975.

LANDSTEINER, K. Über serumagglutine. *Nunch. Med. Wschr.*, v. 49, citado por Gold & Balding, 1975.

LAURENCE J. R.; NEU T. R. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol*, v. 310, p. 131-144, 1999.

LIENER, I. E.; SHARON, N. and GOLDSTEIN, I. J. The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. *Academic Press*, p. 600, 1986.

LIS, H. and SHARON N., Lectins as molecules and as tools. *Annu Rev Biochem*, v. 55, p. 35-67, 1986.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human decay. *Microbiol Res*, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.

LORIS, R.; Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1572, p. 198-208, 2002.

MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of *Leguminosae* seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, 35: 1-156 1957.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 1, p. 71-109, 1998.

MARSH, P.; MARTIN, M. **Oral microbiology**. 3. ed. London : Chapman & Hall, 1992.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.**, v. 8, p. 263-271, 1994.

MINAH, G.E.; SOLOMON, E.S.; CHU, K. The association between dietary sucrose consumption and microbial population shifts at six oral sites in man. **Arch Oral Biol**. v. 30, n. 5, p. 397-401, 1985.

MIRTH, D. B.; MILLER, C. J.; KINGMAN, A.; BOWEN, W. H. Inhibition of Saliva-Induced Aggregation of *Streptococcus mutans* by Wheat Germ Agglutinin. **Caries Res**. v. 13, p. 121-131, 1979.

MIRTH, D. B.; MILLER, C. J.; KINGMAN, A.; BOWEN, W. H. Binding of Salivary Aggregating Factors for *Streptococcus mutans* by Concanavalin A and Fucose-Binding Protein. **Caries Res**. v. 15, p. 1-8, 1981.

MOORE, K. L.; VARKI; MCEVER, R. P.; GMP-140 Binds to a protein receptor on human neutrophils. Evidence for a lectin like interaction. **J Cell Biol**, v. 112, p. 491, 1991.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. (1984) Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. Praga – Tchechoslováquia; **Biologia Plantarum** v. 26, n. 2, p. 113 - 120.

MOSADOMI, H.A., The effect of crude extracts of nine African chewing sticks on oral anaerobies. **J. Med. Microb.**, v. 23, p. 55-60, 1987.

NAGANO, C. S.; MORENO F. B. M. B.; BLOCH JR. C.; PRATES M. V.; CALVETE J. J.; SAKER-SAMPAIO S.; FARIAS W. R. L.; TAVARES T. D.; NASCIMENTO K. S.; GRANGEIRO T. B.; CAVADA B. S.; SAMPAIO A. H. Purification and Characterization of a new Lectin from the Red Marine Alga *Hypnea Musciformis*. **Protein and Peptide Letters**, v. 9, n. 2, p. 159-165(7), 2002

NAUTA, A. J.; CASTELLANO, G.; XU, W.; WOLTMAN, A. M.; BORRIAS, M. C. DAHA, M. R.; VAN KOOTEN, C.; ROOS, A. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. **J Immunol**, v. 173, n. 5, p. 3044-50, 2004.

NOWELL, P. L. Phytphaemagglutinin: an indicator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. **Cancer Res.**, v. 20, p. 462-466, 1960.

NYVAD, B. and KILIAN, M, Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in the caries inactive individuals. **Caries Res.** v. 24, p. 267-272, 1990.

NYVAD, B. Microbial colonization of human tooth surfaces. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl**, v. 32, n. 1, p. 1-45, 1993.

OLSNES, S.; PIHL, A. Toxic lectins and related proteins. *In*: COHEN, P., VAN HEYNINGEN, S., (Ed.). *Molecular action of toxins and viruses*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, p. 51-105, 1982.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; FUJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.* v. 27, n. 2, p. 124-9, 1993.

OSAWA, K.; MATSUMOTO, T.; MARUYAMA, T.; NAITO, Y.; OKUDA, K.; TAKAZOE, I. Inhibitory effects of aqueous extract of cacao bean husk on collagenase of *Bacteroides gingivalis*. *Bull Tokyo Dent Coll*, v. 31, n. 2, p. 125-8, 1990.

OTAKE, S.; NISHIHARA, Y.; MAKIMURA, M.; HATTA, H.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; HIRASAWA, M. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). *J Dent Res.*, v. 70, n. 3, p. 162-6, 1991.

O'TOOLE G. A.; KOLTER R., (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* v. 28, p. 449-461.

PEASANT, C. A. and KORNFELD, S. J. (1972). *J. Biol. Chem.*, Citado por LIENER *et al*, v. 247, p. 6937-6945, 1986.

PEUMANS, W. J. and VAN DAMME, W. J. M. Proposal for a Novel Sistem of Nomeclature of Plant Lectins. *Lectins*, v. 10, p. 105-117, 1995a.

PEUMANS, W. J. and VAN DAMME, E. J. M. Lectins a plant defense proteins. **Plant Physiol**, v. 109, p. 347-352, 1995b.

PEUMANS, W. J.; DE LEY, M. and BROEKAERT, W. F. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Letters**, v. 177, p. 99-103, 1984.

PEUMANS, W. J.; NSIMBA-LUBAKI, M. PEETERS, B. and BROEKAERT, W. F. Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rizoms. **Planta**, v. 164, p. 75-82, 1985.

PINTO, V.G. **Saúde bucal coletiva**. 4^a ed. São Paulo: Ed. Santos; p.165, 262. 2000.

PINTO-DA-SILVA, L. H.; CAMURATE, M.; COSTA, K. A.; OLIVEIRA, S. M . P.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SARAIVA, E. M. B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 1371-1377, 2002.

PISTOLE, T. G. Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. **Annu Rev Microbiol**, v. 35, p. 85-112, 1981.

POBER, J. S.; LAPIERRE, L. A.; STOLPEN, A. H. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: Comparison with tumor necrosis factor and interleucin 1 species. **J. Immunol.**, v. 138, p. 3319, 1987.

POTAPOV, I. M. *Izv. Akad. Nank Kazah S.S.R. Ser., Soviet Union Fiziol.Med.* v. 5, p. 712, 1968.

RAPIN, A. M.; BURGER, M. M. Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. **Adv Cancer Res.**, v. 20, p. 1-91, 1974.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A. and RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 823-826, 1992.

ROGERS, D. J.; BLUNDEN, G. and EVANS, P.R. *Ptilota plumose*, A new source of a blood group B specific lectin. **Medic Laboratory Sciences**, v. 34, p. 193-200, 1977.

ROGERS, D. J.; FISH, B. and BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In: KOCOUREK, J. and FREED, D.L.J. Eds: Lectins, Biology, Biochemistry, **Clinical Biochemistry**, v. 7, p. 49-52, 1990.

ROLLA, G.; CIARDI, J. E.; EGGEN, K. H.; BOWEN, W. H. and AFSETH, J. Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth in vivo,. In R. J. Doyle and J. E. Ciardi (ed.), **Glucosyltransferases, glucans, sucrose and dental caries** (a special supplement to Chemical Senses). IRL Press, Arlington, Va. p. 21-29, 1983.

ROUGÉ, P.; CABBILLAU, C.; BOURNE, Y.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; CAUSSE, H.; AYOUBA, A. Interactions of Plant Lectins with the Components of the Bacterial cell wall Peptideoglycan. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, p. 153-159, 1994.

SAEKI, Y. Effect of seaweed extracts on *Streptococcus sobrinus* adsorption to saliva-coated hydroxyapatite. **Bull Tokyo Dent Coll.**, v. 35, n. 1, p. 9-15, 1994;

SAEVARSDOTTIR, S.; VIKINGSDDOTTIR, T.; VALDIMARSSON, H. The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. **Scand J Immunol**, v. 60, n. 1-2, p. 23-9, 2004.

SAFFER, L. D. and PETRY, W.A.J. Role of the galactose lectin *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infect. Immun.** v. 12, n. 59, p. 4681-4683, 1991.

SAKANAKA, S. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, p. 2307-2311, 1989.

SAMPAIO, A. H. Hemaglutininas de algas marinhas do nordeste brasileiro e isolamento da hemaglutinina de *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUROUX. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 1992.

SAMPAIO, A. H. Lectins from *Ptilota* and *Ulva* species. Tese de Doutorado apresentada a Universidade de Portsmouth, Inglaterra, p. 198, 1997.

SATO, L. K. S. Ingestão de dentifrício por jovens crianças. [online] Disponível em URL: <http://www.odontologia.com>, 2001.

SAYYAH, M.; HADIDI, N. and KAMALINEJAD, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2-3, p. 325-329, 2004.

SCHNEIDER, E.O. The hemagglutinating and precipitating properties of the bean (*Phaseolus*). citado Gold & Balding, 1975. **J. Biol. Chem.**, v. 11, p. 47, 1912.

SEOW, W. K.; AMARATUNGE, A. The effects of acid-etching on enamel from different clinical variants of amelogenesis imperfecta: an SEM study. **Pediatr Dent. J**, v. 20, n. 1, p. 37-42, 1998.

SÉRVULO, K. B. L. M. Isolamento, purificação, caracterização parcial e atividade biológica de uma lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Leguminosae, Papilionoideae, Tephrosieae). Tese de Doutorado em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, 2004.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. **J Antimicrob Chemother**, p. 25, 2004.

SHARON, N. Bacterial Lectins, Cell-Cell Recognition and Infections Disease. **FEBS Lett.** v. 217, n. 2, p.145-157, 1987.

SHARON, N. and LIS, H. LECTINS, Chapman and Hall. London. p. 126, 1989^a.

SHARON, N. and LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). **TIBS**, v. 12, p. 488-491, 1989^b.

SHARON, N. and LIS, H. Lectins - proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays in Biochemistry**, v. 30, p. 59-75, 1995.

SIMINONATO, M. R. L.; MAYER, M. P. A.; CAI, S.; LORENZO, J. L.; ZELANTE, F., Influence of lectins on adhesion of *streptococcus salivarius* to buccal epithelial cells. **Review Microbiology**. v. 25, n. 2, p. 83-85, 1994.

SOJAR, H. T.; SHARMA, A.; GENCO, R. J. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae binds to neoglycoproteins: evidence for a lectin-like interaction. **Biochimie**. v. 86, n. 4-5 p. 245-9, 2004.

SONJU, T.; GLANTZ, P. O. Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. **Arch Oral Biol.** v. 20, n. 10, p. 687-91, 1975.

SOUTHARD, G. L.; BOULWARE, R. T.; WALBORN, D. R.; GROZNIK, W. J. THORNE, E. E. YANKELL, S. L. Sanguinarine, a new antiplaque agent: retention and plaque specificity. **J Am Dent Assoc.** v. 108, n. 3, p. 338-41, 1984.

STILLMARK, H.; **Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen.** Inaugural Dissertation Dorpat – Tese de Doutorado. Universidade de Dorpat, Estônia, 1888.

STORINO, S.P. *Cariologia: procedimentos preventivos.* **REVINTER**, p. 133, 1993.

STRATHMANN M.; WINGENDER J.; FLEMMING H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Microbiol Methods.** v. 50, n. 3, p. 237-48, 2002.

SUSHAMA, M.; GAIKWAD, M.; ISLAM KHAN. pH-dependent aggregation of oligomeric *Artocarpus hirsuta* lectin on thermal denaturation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 311, n. 254-257, 2003.

SUZUKI, Y.; TASUMI, S.; TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; SUETAKE, H. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 136, p. 723-730, 2004.

TAPPUNI, A.R.; CHALLACOMBE, S.J. Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predentate and dentate children and adults. **J Dent Res.**, v. 72, n. 1, p. 31-6, 1993.

TEIXEIRA, E. H.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S. F.; MENESES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. **Protein and Peptide Letters**. v. 8, n. 6, p. 477 – 484, 2001.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. O ambiente oral – uma introdução. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 2. ed. São Paulo: Santos, Cap.1, 13-16 1995.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Tratado de cariologia*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 388p. **Cariologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Santos, 2001. p. 421, 1988.

TURVILLE, S.; WILKINSON, J.; CAMERON, P.; DABLE, J.; CUNNINGHAM, A. L. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. **J Leukoc Biol.**, v. 74, n. 5, p.710-8, 2003.

WANG, X.; ROCHELEAU, T. A.; FUCHS, J. F.; HILLYER, J. F.; CHEN, C. C.; CHRISTENSEN, B. M. A novel lectin with a fibrinogen-like domain and its potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus* against bacteria. **Insect Mol Biol.**, v. 13, n. 3, p. 273-82, 2004.

WEYNE, S.; HARARI, S. Cariologia: implicações e aplicações clínicas. In: BARATIERI, L.N. *et al.* **Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Santos Ed., p. 3-29, 2001.

WIENHAUS, O. Zur biochemie der phases. **Biochemistry**, v. 2, p. 18-228, 1909.

WOLINSKY, L. E.; MANIA, S.; NACHNANI, S.; LING, S. The inhibiting effect of aqueous *Azadirachta indica* (Neem) extract upon bacterial properties influencing in vitro plaque formation. **J Dent Res.**, v. 75, n. 2, p. 816-22, 1996.

WOLINSKY, L. E.; SOTE, E. O. Isolation of natural plaque-inhibiting substances from 'Nigerian chewing sticks'. **Caries Res.**, v. 18, n. 3, p. 216-25, 1984.

WU-YUAN, C.D; GREEN, L, BIRCH, W.X. In vitro screening of Chinese medicinal toothpastes: their effects on growth and plaque formation of mutans streptococci. **Caries Res.**, v. 24, n. 3, p. 198-202, 1990.

UMETSU, K.; YAMASHITA, K. and SUZUKI, T. Purification and carbohydrate binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*cherrydis japonica*). **J. Biochem.**, v. 109, n. 5, p. 718-721, 1991.

UZEDA, M. **Microbiologia Oral: Etiologia da Cárie, Doença Periodontal e Infecções Endodônticas.** Petrópolis – Rj 2002, p.60-63.

VAN DAMME, E. J.; BALZARINI, J.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The monomeric and dimeric mannose-binding proteins from the Orchidaceae species *Listera ovata* and *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities. **Glycoconj J.** v. 11, n. 4, p. 321-32, 1994.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A. and ROUGÉ, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related prote, 17, ins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences** v. 6, p. 575-692, 1998.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v.3, n. 2, p. 97-130, 1993.

YAMADA, Y. and AKETA, K. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 709, p. 220-226, 1982.

YING, H.; JI, X.; HART, M. L.; GUPTA, K.; SAIFUDDIN, M.; ZARIFFARD, M. R.; SPEAR, G. T. Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 20, n. 3, p. 327-35, 2004.

YU, X.Q. and KANOS, M.R. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca Sexta* is induced in response to gram negative bacteria. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 48, p. 37373-37381, 2000.